



**Nuno Miguel da Silva
Maia**

**Nova abordagem no estudo da Distrofia Muscular
das Cinturas tipo 2A**



**Nuno Miguel da Silva
Maia**

**Nova abordagem no estudo da Distrofia Muscular
das Cinturas tipo 2A**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Márcia Oliveira, Assistente Principal de Genética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães – INSA, IP e co-orientação da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao meu querido pai.

o júri

presidente

Fernando José Mendes Gonçalves

Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Maria Gil Roseira Ribeiro

Professora Associada na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa - Porto

Márcia Eduarda Maciel de Oliveira

Assistente Principal da Carreira Técnica Superior de Saúde, Ramo de Genética, no Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães, INSA - Porto

Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

À Doutora Márcia Oliveira agradeço a sua orientação e incentivo, a sua presença e disponibilidade constante ao longo de todo o trabalho e os conhecimentos científicos que me transmitiu. Pela sua entrega, empenho, dedicação e cuidado demonstrado, pela paciência e pela amizade, o meu muito obrigado.

À Professora Adelaide Almeida expresso o meu agradecimento pela sua disponibilidade, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Dr.ª Rosário Santos agradeço a possibilidade que me concedeu em efectuar o trabalho prático na Unidade de Genético Molecular, por todo o apoio e disponibilidade.

Ao Jorge Oliveira e à Emília Vieira por todas as sugestões, pelo incentivo, ajuda, disponibilidade, amizade e apoio científico.

A todos os outros colegas da Unidade de Genética Molecular que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais por todos os valores que me transmitiram, pelo seu amor incondicional, carinho e suporte, a minha maior gratidão.

À Carla e ao André por, embora longe, estarem sempre presentes, pelo seu apoio, carinho e amizade.

A todos os meus amigos pelo companheirismo, apoio e incentivo.

À Raquel pelo apoio incondicional, por estar sempre presente e disponível para ajudar, pela preocupação e pela paciência.

palavras-chave

Distrofias musculares, distrofias musculares das cinturas, distrofia muscular das cinturas tipo 2A, calpainopatia, calpaína 3, análise de proteínas musculares, *western blotting*, actividade autolítica, estudo quantitativo de expressão génica.

resumo

As distrofias musculares são um grupo heterogéneo de doenças genéticas caracterizadas por fraqueza muscular progressiva. Até agora, foram mapeados 18 genes associados a um subgrupo específico de distrofias musculares denominado distrofias musculares das cinturas (*limb-girdle muscular dystrophies*, LGMD). As mutações no gene *CAPN3* são responsáveis pelo fenótipo de calpainopatia ou distrofia muscular das cinturas tipo 2A (LGMD2A), uma das formas mais frequentes de LGMD. O gene *CAPN3* codifica a proteína calpaína 3 (ou CAPN3), uma protease de cisteína dependente de cálcio, específica do músculo esquelético, regulada funcionalmente através da sua actividade autolítica. O mecanismo de patogénese da LGMD2A ainda não se encontra esclarecido, mas pensa-se que em grande parte esteja associado a défices funcionais da CAPN3.

Com o presente trabalho, propõe-se uma nova abordagem de estudo no diagnóstico da LGMD2A combinando técnicas moleculares e análise de proteínas, no sentido de contribuir para um diagnóstico diferencial essencial na caracterização global de doentes com calpainopatia, especificamente nos casos de doentes com sintomas de distrofia muscular não específicos. Amostras de biópsia muscular de 9 doentes com LGMD2A, previamente estudados molecularmente, foram submetidos à análise de proteínas e testes funcionais através de *western blotting* e densitometria. Adicionalmente, foram efectuados estudos de expressão génica utilizando PCR em tempo real quantitativo.

Uma análise global dos resultados obtidos permitiu: (a) completar o diagnóstico molecular efectuado nos doentes 2-7, incluindo a identificação de um defeito funcional da CAPN3 no caso do doente 3; (b) confirmar o diagnóstico clínico no doente 8 (com apenas uma mutação em heterozigotia), também causado pelo défice funcional da proteína; e (c) excluir o envolvimento da CAPN3 nos restantes 2 doentes com apenas um alelo mutado em heterozigotia, devido à elevada expressão observada para o gene *CAPN3* comparativamente com as amostras controlo.

keywords

Muscular dystrophies, limb-girdle muscular dystrophies, limb-girdle muscular dystrophy type 2A, calpainopathy, calpain 3, muscular proteins testing/analysis, western blotting, gene expression quantitative assay.

abstract

Muscular dystrophies comprise a group of heterogeneous genetic diseases characterized by progressive muscle weakness. Until now, eighteen genes have been associated to a specific subgroup of muscular dystrophies called limb-girdle muscular dystrophies (LGMD). Mutations in the *CAPN3* gene are responsible for calpainopathy or limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A), one of the most frequent form of LGMD. The gene *CAPN3* codes for calpain 3 (or CAPN3), a muscle-specific calcium-dependent cysteine protease functionally regulated via its autolytic activity. The pathogenesis mechanism of LGMD2A still continues to be unresolved, however functional defects of CAPN3 seem to be the major cause of the pathology. With the present work, it is proposed a new approach for the LGMD2A diagnostic analysis, combining molecular genetics and protein analysis methodologies in order to contribute to a differential diagnostic essential for global characterization of patients, specifically among patients with non-specific muscular dystrophy symptoms. Muscle biopsy samples of 9 LGMD2A patients, already studied at the molecular genetics level, were subjected to protein analysis and functional tests by western blotting and densitometry analyses. Additionally, gene expression studies were performed using real-time quantitative PCR. A global analysis of the data obtained allowed us: (a) to complement the previous molecular genetics study in patients 2-7, including the identification of a CAPN3 functional defect in patient 3; (b) to confirm the clinical diagnostic in patient 8 (with only one mutation in heterozygous state) also caused by a protein functional defect; and (c) to exclude the CAPN3 implication in the other two patients which presented one mutated allele in heterozygous state, because of the detection of an overexpression of the *CAPN3* gene in comparison to control samples.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Distrofias Musculares	3
1.2 Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2A (LGMD2A)	7
1.3 Mutações no gene <i>CAPN3</i> associadas à LGMD2A	8
1.4 A família das calpaínas	11
1.5 A proteína Calpaína 3	13
1.6 Metodologia de estudo implementada na rotina do diagnóstico molecular da LGMD2A	20
2. OBJECTIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Descrição dos doentes, produtos biológicos e amostras de estudo	27
3.2 Extracção de RNA total de músculo	29
3.3 Síntese de cDNA muscular do gene <i>CAPN3</i> por sequenciação	30
Síntese de cDNA total de músculo e amplificação por RT-PCR	30
Reacção de sequenciação e análise da sequência de cDNA do gene <i>CAPN3</i>	31
3.4 Detecção de alterações no gene <i>CAPN3</i> por MLPA	32
3.5 Quantificação relativa da expressão do gene <i>CAPN3</i> através de PCR em tempo real	35
Síntese de cDNA total de músculo por transcrição reversa	35
PCR em tempo real e quantificação relativa da expressão génica	35
3.6 Estudo proteico muscular: análise semi-quantitativa de proteínas musculares e teste da actividade autolítica da CAPN3	37
Preparação e determinação da concentração de proteína total muscular para análise por <i>Western blotting</i>	37
<i>Western blotting</i>	38
Imunodeteccção com anticorpos monoclonais específicos	39
Análise semi-quantitativa da abundância da CAPN3 e DYSF musculares	40
Teste da actividade autolítica da CAPN3	40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Detecção de novas alterações	45
4.2 Estudos da expressão do gene <i>CAPN3</i>	48
4.3 Análise semi-quantitativa da abundância de CAPN3 e DYSF por <i>Western blotting</i>	53
4.4 Análise da actividade autolítica da CAPN3	57
4.5 Avaliação global dos resultados obtidos	59
5. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTUAS	65
6. BIBLIOGRAFIA	71
6.1 Referências em publicações periódicas	71
6.2 Referências electrónicas	80

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Organização molecular de proteínas envolvidas em diferentes LGMD, em várias regiões das fibras musculares: sarcolema (A), complexo de Golgi (B) e sarcómero (C).	4
Figura 1.2	Localização e distribuição das mutações associadas à LGMD2A ao longo do gene <i>CAPN3</i> . Os 24 exões estão numerados e representados por quadrados verdes.	9
Figura 1.3	Distribuição das mutações <i>missense</i> ao longo do gene e da proteína <i>CAPN3</i> . Os domínios da proteína estão representados por rectângulos cinzentos identificados por números romanos, e as sequências NS, IS1 e IS2 estão representados por rectângulos pretos identificados pelas abreviaturas correspondentes.	10
Figura 1.4	Representação esquemática da estrutura das Calpaínas “típicas”. Os diferentes domínios proteicos estão identificados com números romanos. No domínio II estão identificados os resíduos catalíticos de cisteína (C), histidina (H) e asparagina (N). No caso da Calpaína 3 estão representadas a preto as sequências NS, IS1 e IS2. As regiões <i>EF hand</i> estão representadas a amarelo no domínio IV e VI.	12
Figura 1.5	Organização histológica e estrutural do músculo esquelético. A - Diferentes estruturas constituintes do músculo esquelético. B - Representação esquemática de uma molécula de Titina (a preto) estendida desde o disco Z até à linha M, onde se encontram identificados os locais de ligação à <i>CAPN3</i> (representada a verde): disco Z, banda I (sequência N2A) e linha M. A sequência N2A e o domínio PEVK estão identificados a branco.	15
Figura 1.6	Representação esquemática dos locais de autólise na <i>CAPN3</i> que estão indicados por 1a-b, 2a-b e 3b. Os domínios da proteína estão representados por rectângulos identificados por numeração romana, e as sequências NS, IS1 e IS2 estão representados por rectângulos pretos.	17
Figura 1.7	Representação esquemática do modelo proposto para a activação da <i>CAPN3</i> segundo Taveau <i>et al.</i> 2003, Diaz <i>et al.</i> 2004, Kramerova <i>et al.</i> 2007 e Murphy e Lamb 2009.	18
Figura 3.1	Mutações encontradas nos doentes seleccionados no presente trabalho e respectiva distribuição ao longo do gene. A cada doente corresponde uma cor, conforme está indicado na legenda. Existem doentes que apresentam uma (heterozigotia simples) ou duas mutações (heterozigotia composta e homozigotia). O gene <i>CAPN3</i> está representado pela barra	28

horizontal, em que os rectângulos azuis numerados simbolizam os exões. Nomenclatura usada de acordo com a *Human Genome Variantion Society* (HGVS, <http://www.hgvs.org>). Sequência de referência do gene *CAPN3* utilizada: NM_000070.2.

Figura 4.1	Alterações encontradas após análise da sequência de cDNA do gene <i>CAPN3</i> dos doentes 1 (A) e 9 (B). As setas indicam as mutações r.637c>u (A) e r.1063c>g (B), ambas em heterozigotia. Nomenclatura usada de acordo com a HGVS. Sequência de referência do gene <i>CAPN3</i> utilizada: NM_000070.2.	46
Figura 4.2	Exemplo de resultado obtido com a técnica de MLPA a partir do gDNA de um dos doentes (doente 1). A- Electroferograma que representa as unidade de intensidade de fluorescência relativa a cada pico em função do seu tamanho (nt), onde se visualizam os picos do doente (a cor azul) e da média dos controlos (a cor vermelha); B- Análise de regressão linear, onde se relacionam os dados obtidos para o doente (<i>Patient</i>) e a média dos controlos (<i>Control</i>), para cada uma das sondas usadas, e respectivos SD; C- Tabela com informação relativa a cada uma das sondas: nome (<i>Probe Name</i>), tamanho dos picos (<i>Bin Size</i>) e valor dos quocientes de dosagem e valor dos QD.	47
Figura 4.3	Análise de regressão linear dos dados de MLPA dos doentes 8 (A) e 9 (B).	47
Figura 4.4	Curvas das reacções de amplificação <i>singleplex</i> e <i>duplex</i> de um cDNA controlo, para as sondas <i>CAPN3 A</i> e <i>CAPN3 B</i> . As curvas referentes às reacções <i>singleplex</i> e <i>duplex</i> estão identificadas pelas cores azul e vermelho, respectivamente. ΔR_n , intensidade de fluorescência normalizada em função da fluorescência residual. <i>Cycle</i> , número do ciclo da reacção de PCR em tempo real.	49
Figura 4.5	Rectas de regressão obtidas para avaliar a linearidade da amplificação de uma amostra de cDNA controlo (em diferentes concentrações), a partir das 3 sondas em estudo. A – <i>CAPN3 A</i> ; B – <i>CAPN3 B</i> ; C – <i>GAPDH</i> .	50
Figura 4.6	Exemplo de curvas de amplificação de um controlo (a amarelo), do doente 4 (a roxo), e do doente 9 (a verde) para cada uma das sondas utilizadas, nas reacções de PCR em tempo real: A – <i>CAPN3 A</i> ; B – <i>CAPN3 B</i> ; C – <i>GADPH</i> . ΔR_n , intensidade de fluorescência normalizada em função da fluorescência residual. <i>Cycle</i> , número do ciclo da reacção de PCR em tempo real.	51
Figura 4.7	Representação dos valores de RQ obtidos em cada amostra (<i>sample</i>) após análise informática. Os valores foram corrigidos em função do controlo endógeno. O controlo 5 foi usado como referência nos cálculos comparativos de expressão do gene <i>CAPN3</i> , uma vez que foi aquele que apresentava maior	52

expressão genica entre os controlos usados (RQ=1). A sonda CAPN3 A está representada a verde e a CAPN3 B a azul.

- | | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 4.8 | Análise das proteínas musculares por <i>immunoblotting</i> em homogeneizados de proteína total muscular, de um controlo normal e dos doentes 1- 8. O b-DG foi usado como controlo muscular endógeno. A banda de MIO não transferida no gel de SDS-PAGE foi corada com <i>Coomassie blue R250</i> . | 54 |
| Figura 4.9 | Teste da actividade autolítica da CAPN3 muscular nos doentes 1, 3 e 8 e num controlo normal, no início (0') e depois de 30 minutos (30') de incubação em tampão salino à temperatura ambiente, após <i>Immunoblotting</i> . | 58 |
| Figura 5.1 | Nova abordagem proposta no estudo de LGMD2A, considerando as novas metodologias envolvidas no presente trabalho e novas técnicas emergentes. | 67 |

ÍNDICE DE TABELAS

		Página
Tabela 1.1	Distrofias Musculares das Cinturas: genes, <i>loci</i> , proteínas e fenótipos associados.	5
Tabela 3.1	Descrição dos doentes seleccionados para este estudo.	27
Tabela 3.2	Descrição dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de cDNA do gene CAPN3 por RT-PCR.	31
Tabela 3.3	Interpretação dos valores de QD, obtidos pela técnica de MLPA, indicativo de alterações do número de cópias.	34
Tabela 4.1	Abundâncias relativas da CAPN3 e da DYSF nos homogeneizados musculares analisados por <i>Immunoblotting</i> e densitometria. Os valores obtidos foram normalizados em função da quantidade de MIO não transferida no gel e expressos de acordo com a seguinte escala: -, ausência total; +, abundância normal; ++, abundância superior ao normal.	55
Tabela 4.2	Resumo dos resultados obtidos para cada doente a partir das metodologias realizadas no presente trabalho.	61

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina trifosfato
AldoA	Aldolase A
b-DG	beta-Distroglicano
B/DMD	Distrofia Muscular de Becker/Duchenne
BSA	Albumina sérica bovina
C	Aminoácido cisteína
Ca ²⁺	Ião Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar do mRNA
CAPN1	Proteína calpaína 1
CAPN2	Proteína calpaína 2
CAPN3	Proteína calpaína 3
CAPN3	Gene que codifica a proteína calpaína 3
CGMJM	Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães
CK	Creatina cinase
C _T	<i>Threshold cycle</i>
DAPC	Complexo de proteínas associadas à Distrofina
ddNTP	2,3-didesoxirribonucleotídeos trifosfato
dH ₂ O	Água desionizada
DHPR	Receptores de dihidropiridina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxirribonucleotídeos trifosfato
DYSF	Disferlina
E	Aminoácido glutamato
F	<i>Primer forward</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GAPDH	Gene que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
gDNA	Ácido desoxirribonucléico genómico
H	Aminoácido histidina
HCl	Ácido clorídrico
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IL	Interleucina
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - IP

IS1	<i>Insertion Sequence 1</i>
IS2	<i>Insertion Sequence 2</i>
K	Aminoácido lisina
LGMD	Distrofias Musculares das Cinturas
LGMD1	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 1
LGMD1C	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 1C
LGMD2	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2
LGMD2A	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2A
LGMD2B	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2B
LGMD2I	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2I
LGMD2J	Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2J
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIO	Miosina
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
N	Aminoácido asparagina
NaCl	Cloreto de sódio
NGS	Sequenciação de nova geração
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
NS	<i>Novel Sequence</i>
nt	Nucleótidos
PCR	Reacção da polimerase em cadeia
P	Aminoácido prolina
pb	Pares de bases
QD	Quociente de dosagem
R	<i>Primer reverse</i>
R ²	Coeficiente de correlação linear
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucléico
RQ	Quantidade relativa
RT-PCR	Reacção de transcrição reversa seguida de reacção da polimerase em cadeia
RYR	Receptores da rianodina
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecilsulfato de sódio

SSCA	Análise de polimorfismos de conformação em cadeia simples
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris 2-carboxietil fosfina
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
UMOP	Unidade de Genética Molecular
V	Aminoácido valina
WB	<i>Western blotting</i>
Y	Aminoácido tirosina

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distrofias Musculares

As Distrofias Musculares são um grupo de doenças musculares hereditárias, genotipicamente e fenotipicamente heterogêneo, que envolvem normalmente o músculo esquelético e em que a idade de aparecimento dos primeiros sintomas varia desde a infância até à idade adulta. Mutações nos diversos genes associados a estas patologias são responsáveis, principalmente, pela perda progressiva de força muscular e pela subsequente degradação dos músculos envolvidos. As proteínas codificadas por estes genes encontram-se localizadas em diferentes regiões das fibras musculares, nomeadamente, matriz extracelular, sarcolema, citoesqueleto, citosol e núcleo (Figura 1.1; Cohn e Campbell 2000, Gaina *et al.* 2008).

Algumas das proteínas envolvidas nas Distrofias Musculares fazem parte de um complexo de proteínas associadas à Distrofina (DAPC), uma proteína estrutural do músculo que é responsável pela ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular. Mutações no gene da Distrofina originam a Distrofia Muscular de Becker/Duchenne (B/DMD), uma Distrofia Muscular recessiva ligada ao cromossoma X. O complexo DAPC é constituído, para além da Distrofina, pelos complexos Distroglicano e Sarcoglicano, por Integrinas e pela Caveolina (Figura 1.1). Mutações nos genes que codificam as proteínas do complexo DAPC destabilizam a arquitectura das células musculares e tornam o músculo mais susceptível a lesões, como necrose, evento este característico das células distróficas (Nowak e Davies 2004).

Actualmente estão identificados 18 genes associados a um grupo específico de Distrofias Musculares progressivas denominadas Distrofias Musculares das Cinturas (LGMD, *Limb-Girdle Muscular Dystrophies*), caracterizadas pelo envolvimento dos músculos das cinturas pélvica e escapular (Figura 1.1 e Tabela 1.1).

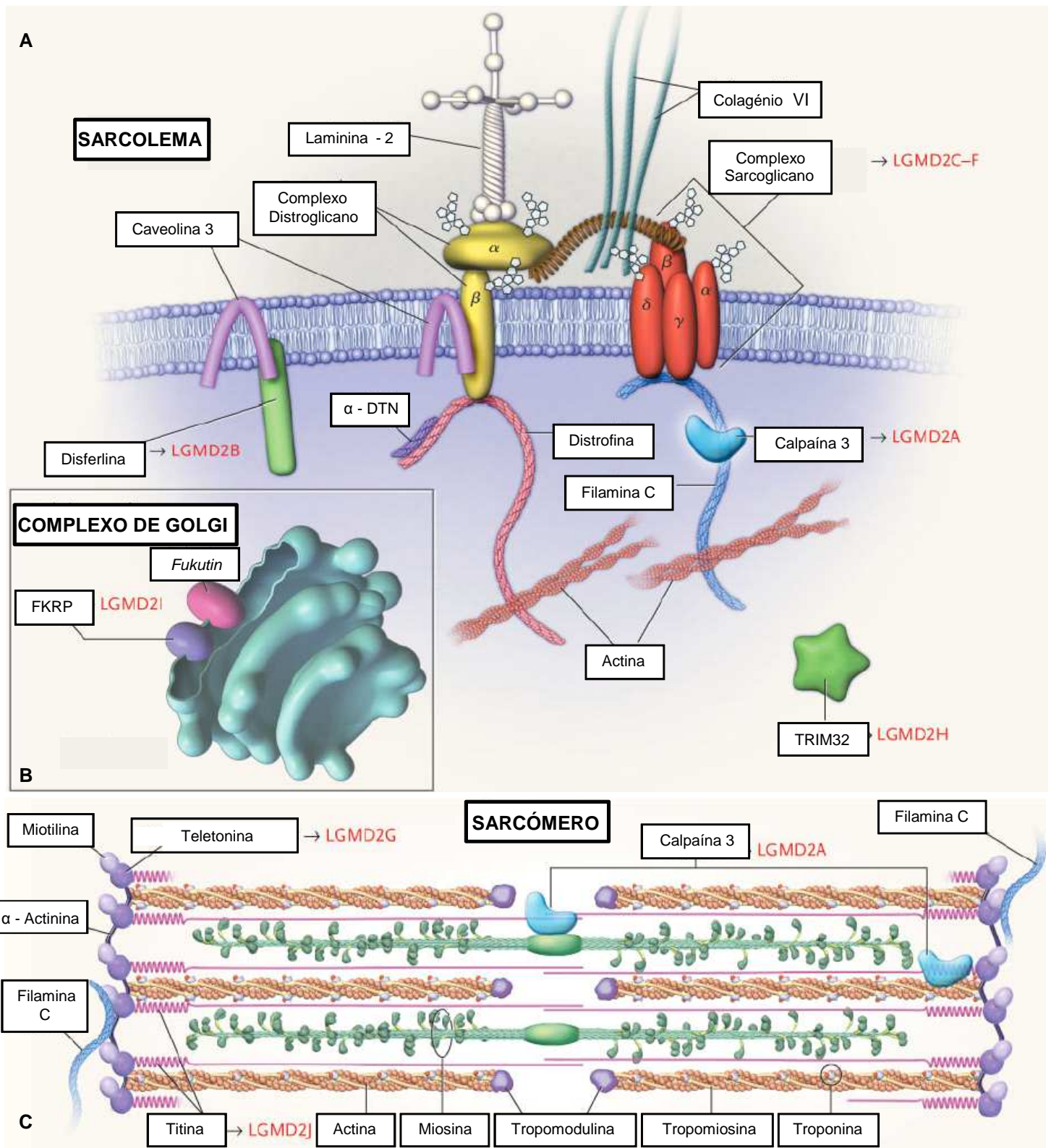


Figura 1.1. Organização molecular de proteínas envolvidas em diferentes LGMD, em várias regiões das fibras musculares: sarcolema (A), complexo de golgi (B) e sarcômero (C) (Zatz e Starling 2005).

Tabela 1.1. Distrofias Musculares das Cinturas: genes, *loci*, proteínas e fenótipos associados (<http://www.musclegenetable.org>).

Fenótipo	Gene Associado	Locus Genómico	Proteína
LGMD1A	<i>MYOT</i>	5q31	Miotilina
LGMD1B	<i>LMNA</i>	1q21.2-q21.3	Lamina A/C
LGMD1C	<i>CAV3</i>	3p25	Caveolina 3
LGMD1D	?	7q	?
LGMD1E	?	6q23	?
LGMD1F	?	7q32	?
LGMD1G	?	4q21	?
LGMD2A	<i>CAPN3</i>	15q15.1-q21.1	Calpaína 3
LGMD2B	<i>DYSF</i>	2p12-14	Disferlina
LGMD2C	<i>SGCG</i>	13q12	Sarcoglicano γ
LGMD2D	<i>SGCA</i>	17q21	Sarcoglicano α
LGMD2E	<i>SGCB</i>	4q12	Sarcoglicano β
LGMD2F	<i>SGCD</i>	5q33-q34	Sarcoglicano δ
LGMD2G	<i>TCAP</i>	17q12	Teletonina
LGMD2H	<i>TRIM32</i>	9q33.2	<i>Tripartite motif-containing protein 32</i>
LGMD2I	<i>FKRP</i>	19q13.33	<i>Fukutin-related protein</i>
LGMD2J	<i>TTN</i>	2q31	Titina
LGMD2K	<i>POMT1</i>	9q34.1	<i>O-mannosyltransferase I</i>
LGMD2L	<i>ANO5</i>	11p14.3	Anoctamina 5
LGMD2M	<i>FKNT</i>	9q31-q33	<i>Fukutin</i>
LGMD2N	<i>POMT2</i>	14q24.3	<i>O-mannosyltransferase II</i>
LGMD2O	<i>POMGNT1</i>	1p34.1	<i>O-linked mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase</i>

As LGMD estão divididas em 2 tipos consoante o gene envolvido e o padrão de hereditariedade. As formas autossómicas dominantes (LGMD tipo 1, LGMD1), as mais comuns, apresentam uma prevalência aproximada de 1:15000, consoante a região geográfica em estudo, enquanto que as formas recessivas (LGMD tipo 2, LGMD2) representam apenas 10% das formas de LGMD (Piluso *et al.* 2005). Dentro destes 2 tipos, verifica-se uma grande variabilidade quer ao nível genético, quer ao nível fenotípico: 3 genes e 7 *loci* associados aos fenótipos LGMD1A-G e 15 genes associados aos fenótipos LGMD2A-O (Tabela 1.1) (Bushby 1999, Zatz *et al.* 2003, Laval e Bushby 2004).

A heterogeneidade fenotípica observada nos doentes LGMD é traduzida por diferenças na idade de aparecimento, no modo de progressão e na apresentação clínica da doença.

De uma forma geral, nas LGMD verifica-se, clinicamente, o aparecimento precoce (normalmente na primeira década de vida, contudo pode estender-se até à meia idade) de degeneração da musculatura das cinturas, começando pela cintura pélvica, e progredindo depois para a cintura escapular (Beckmann 1999, Zatz *et al.* 2003, Laval e Bushby 2004).

Na literatura foram descritos casos mais severos de doentes LGMD que apresentam, além dos músculos das cinturas, outros grupos musculares alterados. Normalmente, não existe envolvimento dos músculos faciais (Kramerova *et al.* 2007).

Frequentemente, as LGMD apresentam uma progressão lenta, que pode ainda resultar em morbilidade significativa, incapacidade motora e morte prematura. Os níveis séricos de creatina cinase (CK) encontram-se geralmente aumentados (Ohledieck 1996, Beckmann 1999, Zatz *et al.* 2003, Laval e Bushby 2004, Barresi 2011).

A análise histopatológica da biópsia muscular revela fibras musculares tipicamente necróticas com núcleos localizados numa posição central (em vez da sua normal localização periférica) e, por vezes, fenómenos de apoptose celular (Zatz *et al.* 2003, Laval e Bushby 2004). No entanto, estes fenómenos não são específicos ou particulares de nenhum tipo de LGMD (Barresi 2011).

1.2 Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2A (LGMD2A)

Alterações no gene *CAPN3* são responsáveis pelo fenótipo LGMD tipo 2A (LGMD2A), de transmissão autossómica recessiva (Richard *et al.* 1995), sendo esta uma das formas mais comuns de LGMD (Pollitt *et al.* 2001, Fanin *et al.* 2005), afectando ~35,1 % dos doentes deste grupo de patologias (Piluso *et al.* 2005), o que se traduz numa prevalência aproximada de 1:100000 (Angelini *et al.* 2007, Duno *et al.* 2008). Este gene codifica a proteína Calpaína 3 (CAPN3), uma protease de cisteína expressa predominantemente no músculo esquelético, onde se encontra associada à Titina, uma proteína muscular elástica de elevado peso molecular (Moreira *et al.* 2000, Fanin *et al.* 2001, Navarro e Teijeira 2004).

À LGMD2A está associada uma grande heterogeneidade clínica intra e interfamiliar, que é devida não só à grande variabilidade encontrada na forma de progressão da doença, mas também à idade de aparecimento e aos primeiros sintomas manifestados pelo doente (Zatz *et al.* 2003, Laval e Bushby 2004, Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007).

De uma forma geral, os doentes LGMD2A apresentam envolvimento selectivo e simétrico dos músculos proximais das cinturas pélvica e escapular, a maioria tem contracturas graves e os níveis séricos de CK podem variar desde ligeiramente até 50 vezes superior ao valor normal (Sáenz *et al.* 2005, Zatz e Starling 2005, Straub e Bushby 2006, Kramerova *et al.* 2007). A progressão da doença é geralmente lenta mas progressiva, de tal forma que se verifica a perda de capacidade de andar num intervalo variável de idades (normalmente uma a duas décadas depois do diagnóstico confirmado). Nestes doentes não se observa atraso mental, distúrbios faciais ou cardíacos (Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007).

O estudo histopatológico do músculo dos doentes LGMD2A mostra um padrão tipicamente distrófico de fibras de tamanho variável, associado normalmente a fenómenos activos de necrose e regeneração, desorganização mitocondrial e, menos frequentemente, à ocorrência de processos inflamatórios (em fases pré-sintomáticas), atrofia de fibras musculares e acumulação de glicogénio (Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007, Sáenz *et al.* 2008). Numa fase avançada da doença, este estudo revela, maioritariamente, a presença de fibras lobuladas, caracterizadas por fibras de tamanho variável que formam um padrão lobular típico e que apresentam distribuição anormal das mitocôndrias no espaço intermiofibrilar. No entanto, as fibras lobuladas não

representam uma alteração específica da LGMD2A, estando presentes noutras doenças neuromusculares (Figarella-Branger *et al.* 2002, Keira *et al.* 2007).

É possível observar alterações secundárias na expressão da CAPN3 no estudo patológico de amostras musculares de doentes afectados com outras Distrofias Musculares, como LGMD1C, LGMD2B, LGMD2I e LGMD2J (Anderson *et al.* 2000, Groen *et al.* 2007, Charlton *et al.* 2009, Luo *et al.* 2011). Paralelamente, também já foi mostrado em doentes LGMD2A défice secundário de Disferlina (DYSF), uma proteína estrutural do músculo, associado ao défice primário de CAPN3 (Anderson *et al.* 2000, Luo *et al.* 2011).

Ao contrário do que acontece com outras Distrofias Musculares relacionadas com o complexo DAPC, a degeneração das fibras musculares observadas nos doentes LGMD2A não ocorre devido à ruptura da membrana celular. Nestes doentes verifica-se uma correcta localização e normal expressão de proteínas do sarcolema, como a Distrofina, Sarcoglicanos e Merosina (Dugez *et al.* 2006).

Actualmente, a LGMD2A é considerada apenas como uma forma comum de Calpainopatia, uma vez que um largo espectro de fenótipos (como níveis elevados de CK e miopatia distal) têm vindo a ser associados a mutações no gene *CAPN3* (Luo *et al.* 2011).

1.3 Mutações no gene *CAPN3* associadas à LGMD2A

Como referido anteriormente, a LGMD2A resulta de mutações no gene *CAPN3*, que codifica a proteína CAPN3. Este gene apresenta 24 exões, está localizado em 15q15.1-q21.1 e origina um transcrito de ~3,5 kb (Fanin *et al.* 2008). Foram também descritos outros transcritos associados a mecanismos de *splicing* alternativos (Chiannikulchai *et al.* 1995, Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007).

Actualmente, encontram-se descritas cerca de 450 mutações no gene *CAPN3* (<http://www.dmd.nl>; Luo *et al.* 2011), incluindo mutações de todos os tipos (Figura 1.2; Zatz e Starling 2005, Duguez *et al.* 2006, Kramerova *et al.* 2007).

As mutações *missense*, as mais frequentemente encontradas no gene *CAPN3*, encontram-se distribuídas por quase todo o gene (Figuras 1.2 e 1.3); no entanto, a sua

distribuição não é homogênea. Estas mutações localizam-se com maior frequência nos domínios proteicos IIa, IIb, III e IV, enquanto que as regiões *Insertion Sequence 1* (IS1) e *Insertion Sequence* (IS2) parecem ser aquelas que apresentam menor número de mutações *missense* associadas (Figura 1.3; Piluso *et al.* 2005, Kramerova *et al.* 2007). As regiões IS1 e IS2 são, em conjunto com a *Novel Sequence* (NS), regiões únicas da CAPN3, que não existem nas outras Calpaínas “típicas” (ver Capítulos 1.4 e 1.5).

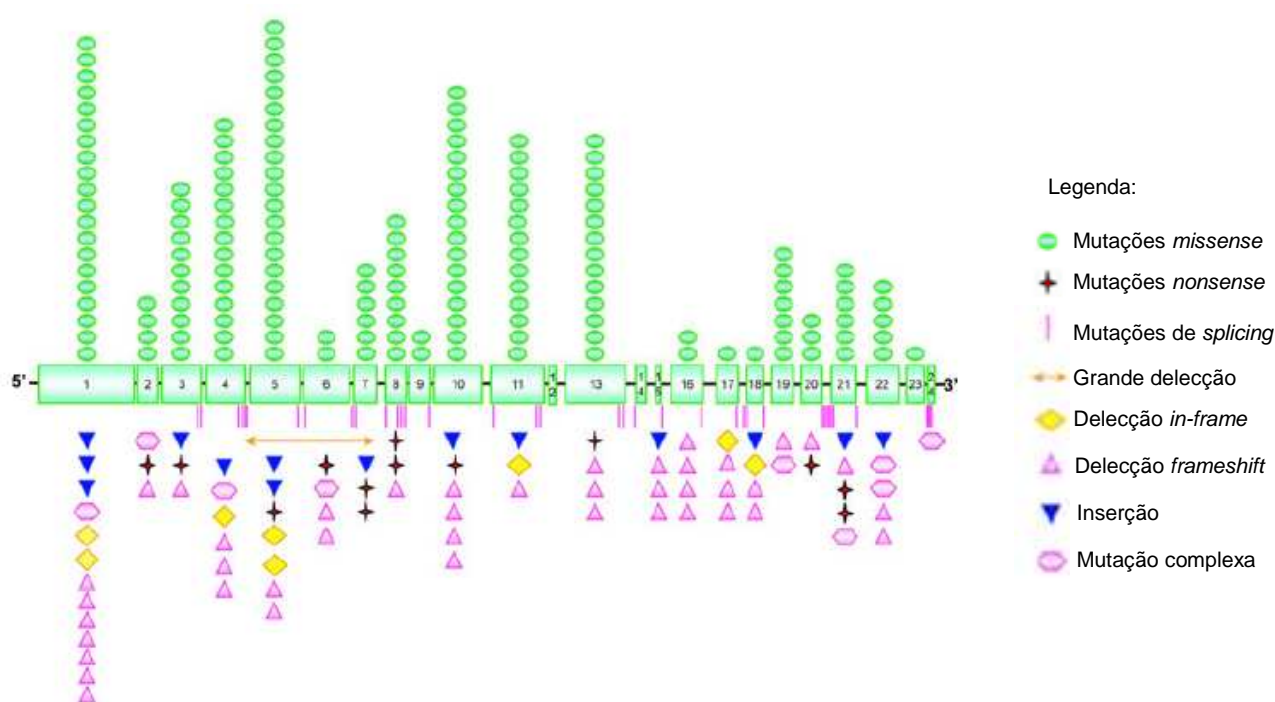


Figura 1.2. Localização e distribuição das mutações associadas à LGMD2A ao longo do gene CAPN3. Os 24 exões estão numerados e representados por quadrados verdes (Duguez *et al.* 2006).

As variações intrónicas do gene CAPN3 constituem cerca de 15 % de todas as alterações descritas (<http://www.dmd.nl>). Contudo, a frequência destas alterações pode estar subestimada, uma vez que as regiões intrónicas não são estudadas na sua totalidade e a eficiência na detecção de transcritos mutados é baixa devido a fenómenos de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (Nascimbeni *et al.* 2010). Este mecanismo, presente nas células eucarióticas, permite reconhecer e degradar mRNA que apresentem codões de terminação prematuros ou que não tenham concluído o normal processo de

“maturação”. Estes mRNA aberrantes são assim degradados rapidamente, presumivelmente antes da acumulação das proteínas deficientes, que podem provocar efeitos adversos na célula (Baker e Parker 2004). Por estes factos, os efeitos das alterações intrónicas detectadas no mecanismo de *splicing* são geralmente inferidas informaticamente através de análises *in silico* (Nascimbeni *et al.* 2010).

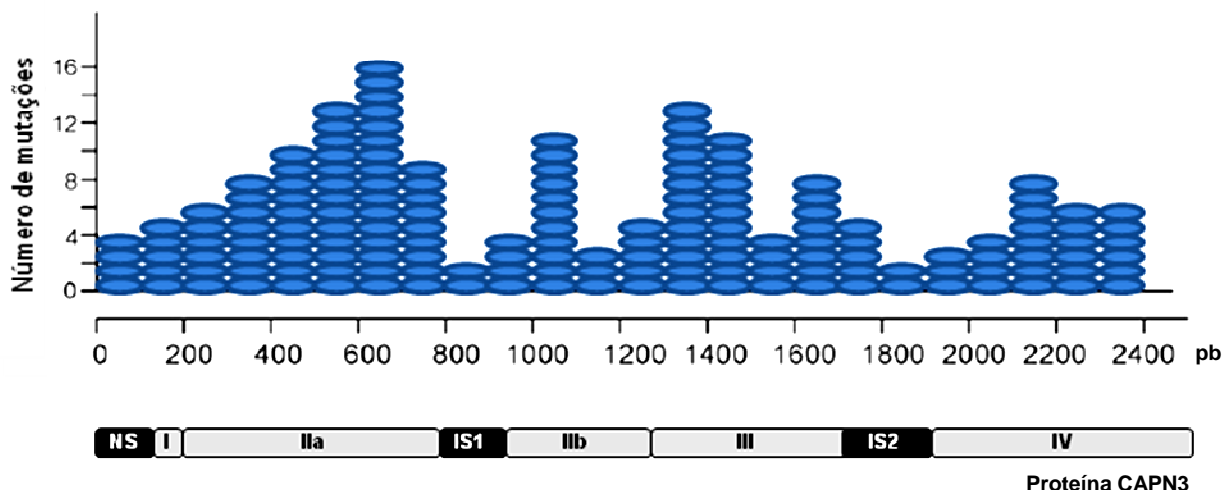


Figura 1.3. Distribuição das mutações *missense* ao longo do gene e da proteína CAPN3. Os domínios da proteína estão representados por rectângulos cinzentos identificados por números romanos, e as sequências NS, IS1 e IS2 estão representados por rectângulos pretos identificados pelas abreviaturas correspondentes (Kramerova *et al.* 2007).

A extensa heterogeneidade de mutações no gene *CAPN3* torna difícil tirar conclusões sobre as implicações genótipo/fenótipo. No entanto, apesar da variabilidade existente, as mutações *missense* parecem estar normalmente associadas a um fenótipo menos severo do que as mutações que dão origem a uma proteína truncada (Fanin *et al.* 2003). Adicionalmente, verificou-se que, de uma forma geral, estas últimas mutações parecem estar mais associadas à ausência total de expressão de CAPN3 no músculo, enquanto as mutações *missense* a um défice parcial da actividade enzimática. Por outro lado, estudos efectuados por Fanin *et al.* (2007) mostraram que alguns dos doentes com abundância normal da CAPN3 apresenta défice na função da proteína.

Estudos de expressão de diversos genes em doentes LGMD2A, recorrendo à tecnologia de *microarrays* e estudos quantitativos de PCR em tempo real (*Real time-PCR*), demonstraram a sobreexpressão de determinados genes codificadores de

proteínas associadas, na sua maioria, à matriz extracelular, a processos de adesão celular, ao sarcómero e a mecanismos de transdução de sinal, o que sugere a existência de mecanismos de resposta compensatória do músculo ao défice muscular da CAPN3. Genes codificadores de imunoglobulinas e da Interleucina 32 (IL32) surgiram também sobreexpressos nestes doentes, o que pode explicar a infiltração celular de eosinófilos, típica dos processos de inflamação observados na fase pré-sintomática da doença. Uma vez que alguns destes genes também se encontram sobreexpressos noutras patologias distróficas, este fenómeno não é considerado específico da LGMD2A (Sáenz *et al.* 2008).

1.4 A família das Calpaínas

A proteína CAPN3 envolvida na LGMD2A pertence à família das Calpaínas, uma família de proteases de cisteína não-lisossomais, cuja actividade é desencadeada pela presença de iões cálcio (Ca^{2+}) e fosfolípidos. Estas enzimas existem em quase todos os seres vivos, desde os seres humanos até aos microrganismos (Berti e Storer 1995, Suzuki *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007). As Calpaínas estão envolvidas numa grande variabilidade de processos intracelulares (motilidade celular, apoptose, diferenciação celular, regulação do ciclo celular e transdução de sinal; Cohen *et al.* 2006) e têm sido associadas a diferentes patologias, como distrofias musculares, *diabetes mellitus* e doenças degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (Macqueen *et al.* 2010).

No genoma humano existem 14 genes que codificam diferentes Calpaínas (Macqueen *et al.* 2010, Nascimbeni *et al.* 2010). Estas estão divididas em 2 grandes grupos, Calpaínas “típicas” e Calpaínas “atípicas”, que apresentam diferenças ao nível da organização dos domínios que as caracterizam (Hosfield *et al.* 1999, Zatz e Starling 2005).

As Calpaínas “típicas” Calpaína 1 (CAPN1 ou μ -calpaína) e 2 (CAPN2 ou m-calpaína) foram as primeiras a ser descobertas e, por isso, as mais estudadas. Estas enzimas parecem ter um papel relevante na remodelação do citoesqueleto, na activação plaquetária e na cura de ferimentos (Taveau *et al.* 2003).

Este grupo de Calpaínas é caracterizado por 2 heterodímeros: uma subunidade pequena e uma subunidade grande (Figura 1.4). A subunidade grande de 80 kDa é responsável pela actividade catalítica de protease e a subunidade pequena de 28 kDa

parece ser vital para a manutenção da estrutura, regulação e estabilidade da subunidade grande (Kramerova *et al.* 2007).

A subunidade grande das Calpaínas “típicas” é constituída por 4 domínios proteicos (Figura 1.4).

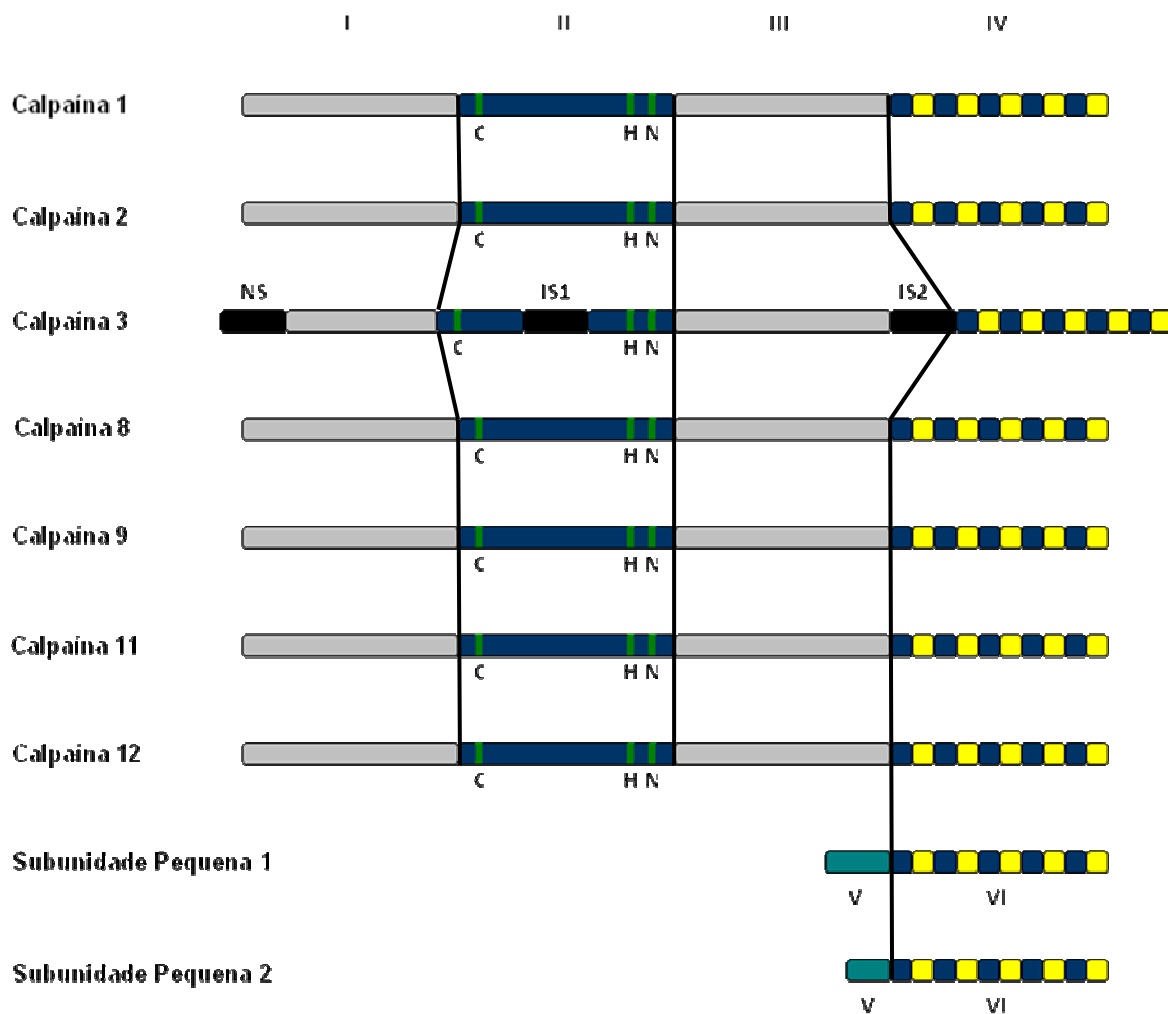


Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura das Calpaínas “típicas”. Os diferentes domínios proteicos estão identificados com números romanos. No domínio II estão identificados os resíduos catalíticos de cisteína (C), histidina (H) e asparagina (N). No caso da Calpaína 3 estão representadas a preto as sequências NS, IS1 e IS2. As regiões *EF hand* estão representadas a amarelo no domínio IV e VI (Kramerova *et al.* 2007).

O domínio I interage com a subunidade pequena permitindo a estabilização dos heterodímeros. O domínio II contém a tríade catalítica (cisteína, histidina e asparagina) necessária à actividade proteolítica da enzima. O domínio III corresponde a um domínio de ligação aos iões Ca^{2+} e fosfolípidos, de estrutura similar aos domínios C2 da

Fosfolipase C ou da Proteína cinase C. O domínio IV é também um domínio de ligação ao Ca^{2+} , de estrutura similar à Calmodulina, com 5 regiões *EF hand*. Estas regiões correspondem a domínios estruturais do tipo *hélice-loop-hélice*, típico da família de proteínas que ligam iões Ca^{2+} . Cada região *EF hand* é composta por duas hélices dispostas perpendicularmente, ligadas por um *loop* ao qual se liga o Ca^{2+} (Zatz e Starling 2005).

Pensa-se que o domínio III está envolvido na tradução de um sinal originado pela ligação do Ca^{2+} ao domínio IV para o domínio catalítico II (Hosfield *et al.* 1999, Strobl *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2004, Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007).

Na literatura encontram-se descritas duas subunidades pequenas constituintes das Calpaínas “típicas”, denominadas subunidades I e II (Figura 1.4; Hosfield *et al.* 1999, Strobl *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2004, Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007). Estas subunidades são formadas pelos domínios V e VI. O primeiro é rico em resíduos de glicina e prolina, e o segundo é semelhante ao domínio IV da subunidade grande e apresenta cinco regiões *EF hand* (Strobl *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007).

As Calpaínas “atípicas” (por exemplo, Calpaínas 5, 6, 7, 10 e 15) diferem das Calpaínas “típicas” na organização dos domínios proteicos. Foi demonstrado que estas Calpaínas apresentam um domínio catalítico II similar ao das Calpaínas “típicas”, mas diferem na composição dos domínios I e IV. Para além destas diferenças, as Calpaínas “atípicas” não possuem regiões *EF hand*, desconhecendo-se se a sua actividade está dependente de Ca^{2+} (Strobl *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2004, Zatz e Starling 2005).

1.5 A proteína Calpaína 3

A CAPN3 (94 kDa, 821 aminoácidos), inicialmente denominada p94, pertence ao grupo das Calpaínas “típicas”, e apresenta uma expressão elevada no tecido muscular esquelético, mas não significativa noutros tecidos (estômago, intestino, baço, timo, cérebro, rim, fígado, pulmão ou coração; Navarro e Teixeira 2004, Zatz e Starling 2005, Duguez *et al.* 2006, Kramerova *et al.* 2007).

Com base em estudos experimentais, a CAPN3 foi localizada em diversos constituintes das fibras musculares (nomeadamente sarcómero, núcleo, mitocôndria e retículo sarcoplasmático; Figura 1.5) e em junções miotendinosas (Sorimachi *et al.* 1989, Taveau *et al.* 2003, Navarro e Teijera 2004, Zatz e Starling 2005, Cohen *et al.* 2006, Duguez *et al.* 2006, Kramerova *et al.* 2007, Charlton *et al.* 2009, Ojima *et al.* 2011).

Como referido anteriormente, a CAPN3 encontra-se predominantemente ligada à Titina ao nível muscular. Esta é uma proteína muscular “gigante” (~4 MDa), que se estende ao longo de metade do comprimento do sarcómero, desde a linha M até ao disco Z (Figura 1.5A). A Titina desempenha um papel fundamental na manutenção da estrutura do sarcómero (incluindo a compartimentação de enzimas metabólicas e o correcto posicionamento dos túbulos transversos e do retículo sarcoplasmático) e é responsável pela controlo da tensão passiva ocorrida durante o processo de contracção-relaxamento muscular (Ermolova *et al.* 2011).

A CAPN3 liga-se à Titina em 3 regiões distintas no sarcómero: na banda I (por intermédio da sequência N2A da Titina), na linha M e no disco Z (Figura 1.5B; Taveau *et al.* 2003, Cohen *et al.* 2006, Duguez *et al.* 2006, Lebert e Benyamin 2006, Murphy 2009). A sequência N2A da Titina corresponde a 1 dos 2 elementos responsáveis pela sua capacidade extensível ao nível da banda I, e é composta por 4 domínios semelhantes às Imunoglobulinas (Ig) e por uma sequência única de 106 resíduos de aminoácidos. O segundo elemento extensível (domínio PEVK; Figura 1.5B) é rico em resíduos de prolina (P), glutamato (E), valina (V) e lisina (K) e encontra-se localizado junto à sequência N2A (Cazorla *et al.* 2000).

Estruturalmente, a CAPN3 apresenta cerca de 50 % de homologia com as Calpains “típicas” 1 e 2 (Morré *et al.* 2010). Ao contrário dos restantes membros do grupo, a CAPN3 não forma heterodímeros com as subunidades pequenas, mas homodimeriza com ela própria por intermédio das sequências *EF hands* do seu domínio IV (Figura 1.4; Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007, Murphy 2009).

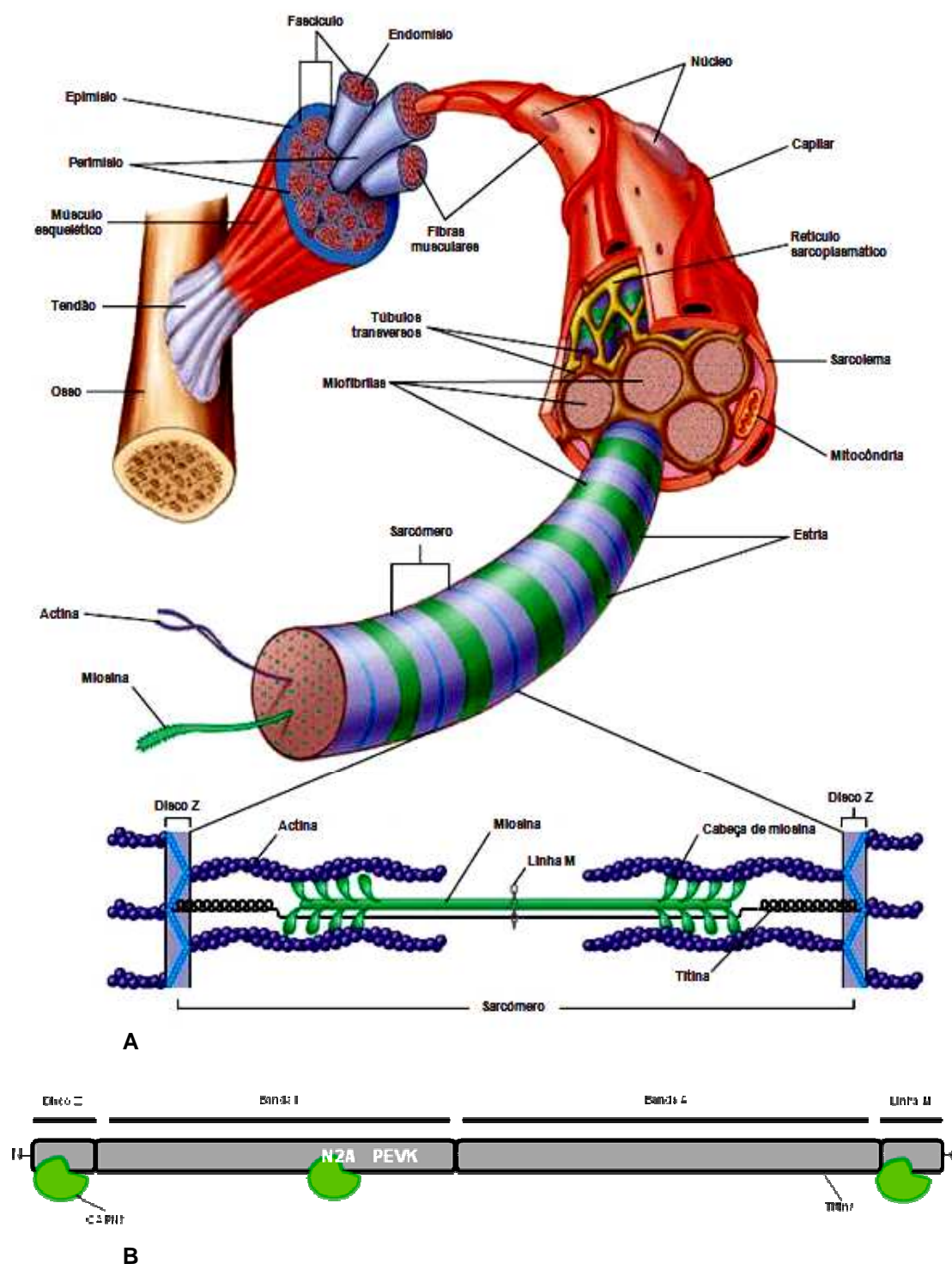


Figura 1.5. Organização histológica e estrutural do músculo esquelético. **A** - Diferentes estruturas constituintes do músculo esquelético. **B** - Representação esquemática de uma molécula de Titina (a preto) estendida desde o disco Z até à linha M, onde se encontram identificados os locais de ligação à CAPN3 (representada a verde): disco Z, banda I (seqüência N2A) e linha M. A seqüência N2A e o domínio PEVK estão identificados a branco. **A**, <http://www.rci.rutgers.edu/~uzwaik/AnatPhys/APFIIILect12.html>. **B**, Duguez *et al.* 2006).

A CAPN3 possui na sua estrutura 3 regiões únicas não encontradas nas outras Calpaínas “típicas”: NS, IS1 e IS2 (Fanin *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007).

A região NS é rica em prolinas, é codificada pelo exão 1 e localiza-se na região N-terminal do domínio I da CAPN3. Esta região corresponde a um propeptídeo de 47 aminoácidos de função desconhecida (Duguez *et al.* 2006, Kramerova *et al.* 2007).

O domínio II apresenta homologia de cerca de 69 % e 68 % com o mesmo domínio das Calpaínas 1 e 2, respectivamente. Neste domínio encontra-se inserida a sequência IS1 de 48 aminoácidos, que divide o domínio II em 2 subdomínios IIa e IIb (Fanin *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007). Esta sequência é codificada pelo exão 6 e contém 3 locais de autólise: Y247, N292 e Y322 (Duguez *et al.* 2006). O local de inserção desta sequência dista apenas 5 aminoácidos do resíduo activo de histidina (Figura 1.4). A sequência IS1 parece actuar como um propeptídeo interno, bloqueando o acesso ao centro activo porque, na presença de Ca^{2+} , este propeptídeo é removido por autólise, facilitando o acesso da protease ao substrato (Fanin *et al.* 2003, Taveau *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007). Recentemente, Macqueen *et al.* (2010) verificaram que a deleção da sequência IS1 afecta a actividade autolítica da CAPN3, mas não a sua actividade proteolítica.

A sequência IS2 é constituída por 77 resíduos de aminoácidos, encontra-se entre os domínios proteicos III e IV da CAPN3 e é codificada pelos exões 15 e 16 (Duguez *et al.* 2006, Kramerova *et al.* 2007). Nesta região existe uma sequência básica de 9 aminoácidos (PVKKKKKNKP) que parece ser a responsável pelo endereçamento da CAPN3 para o núcleo (Sorimachi *et al.* 1995, Duguez *et al.* 2006). Paralelamente, estudos realizados em leveduras colocaram a hipótese da sequência IS2 actuar como um intermediário na ligação da CAPN3 à Titina (Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007, Murphy 2009, Macqueen *et al.* 2010). Fanin *et al.* (2004) sugeriram ainda que a ligação à Titina pode permitir a estabilização da CAPN3 e a prevenção da sua autólise. Por consequência, a quebra desta ligação conduziria à activação local da enzima nas miofibras, onde se iniciaria a proteólise de diversas proteínas do citoesqueleto.

Ensaio *in vitro* de teste da função proteolítica da CAPN3 permitiram concluir que esta proteína é capaz de actuar sobre diversos substratos, interferindo nos diversos processos celulares em que estes participam, nomeadamente, na regulação de factores de transcrição envolvidos na expressão de diversos genes, na regulação dos fenómenos

de apoptose celular, na diferenciação das células musculares, na formação e remodelação do sarcômero, na regulação do citoesqueleto e na manutenção da integridade muscular (Cohen *et al.* 2006, Angelini *et al.* 2007, Kramerova *et al.* 2007, Murphy 2009). Nesses ensaios foi mostrada, por exemplo, a degradação da Filamina C, da Talina, da Vinexina e da Titina (nomeadamente na região PEVK e na linha M) pela CAPN3 (Taveau *et al.* 2003, Zatz e Starling 2005, Duguez *et al.* 2006, Ermolova *et al.* 2011).

O modo de activação enzimática da CAPN3 tem sido objecto de estudo por parte de vários investigadores, tendo sido efectuados diversos ensaios experimentais com a finalidade de compreender o mecanismo subjacente a este processo.

De uma forma geral, o modelo de activação da CAPN3 proposto por 4 grupos de autores (Taveau *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007, Murphy e Lamb 2009) baseia-se na hipótese de que a CAPN3 só se torna proteoliticamente activa quando a sequência IS1 é completamente removida na presença de iões Ca^{2+} e após quebra da ligação à Titina. Diaz e os seus colaboradores (2004) demonstraram que, na presença de Ca^{2+} , a activação da CAPN3 começa com a clivagem dos locais de autólise da região N-terminal das sequências NS (1a) e IS1 (1b) (Figuras 1.6 e 1.7). Consequentemente, é formado um polipéptido de ~60 kDa constituído pelo subdomínio IIb e pelos domínios III e IV que, contudo, se mantém associado ao domínio I e ao subdomínio IIa (Murphy e Lamb 2009). Após esta primeira clivagem, ocorre a remoção completa das sequências NS e IS1 através da clivagem nos locais de autólise 2a, 2b e 3b, permitindo alterações conformacionais dos domínios que resultam na formação da tríada catalítica (Figuras 1.6 e 1.7; Taveau *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007). Desta forma activadas, estas CAPN3 podem, posteriormente, activar outras CAPN3 que não receberam o sinal de activação, gerando amplificação deste sinal em cascata que resulta na activação global da *pool* de CAPN3 muscular (Figura 1.7; Taveau *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004).



Figura 1.6. Representação esquemática dos locais de autólise na CAPN3 que estão indicados por 1a-b, 2a-b e 3b. Os domínios da proteína estão representados por rectângulos identificados por numeração romana, e as sequências NS, IS1 e IS2 estão representados por rectângulos pretos (Taveau *et al.* 2003 e Diaz *et al.* 2004).

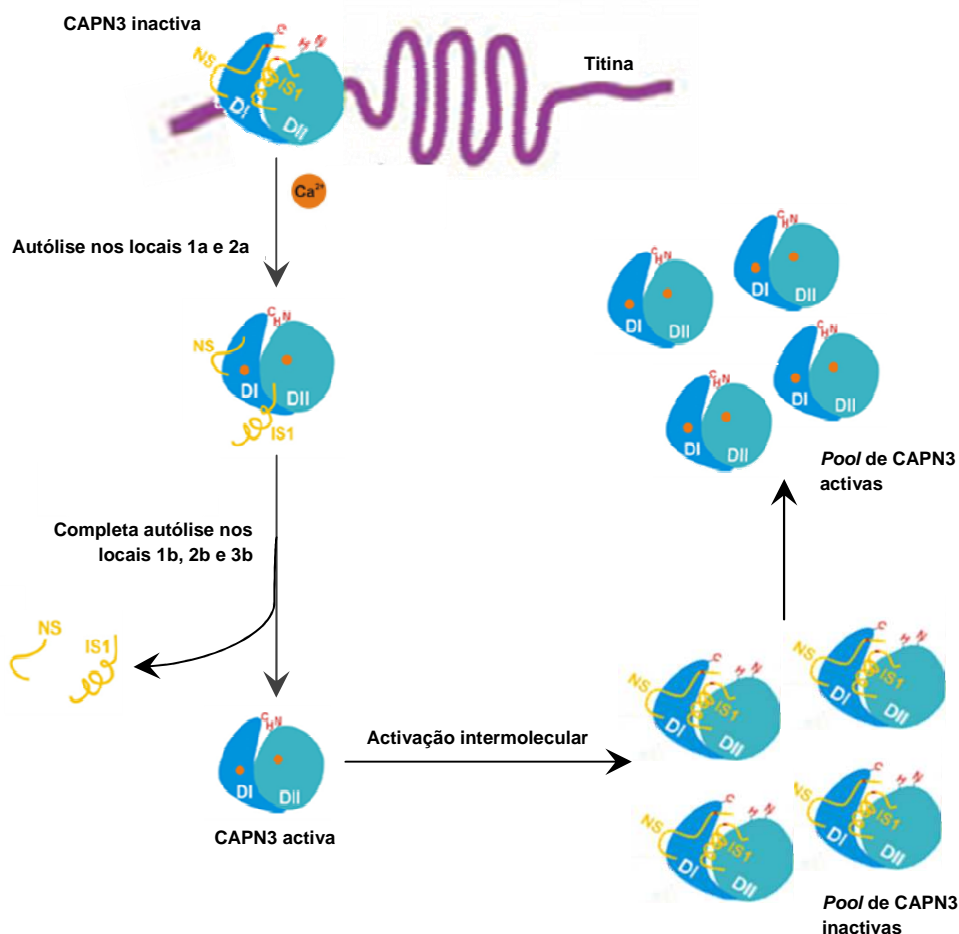


Figura 1.7. Representação esquemática do modelo proposto para a activação da CAPN3 segundo Taveau *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004, Kramerova *et al.* 2007 e Murphy e Lamb 2009.

Como resultado das clivagens nos locais de autólise, é possível observar o desaparecimento completo da banda *full-length* da proteína (~94 kDa) e o aparecimento progressivo de bandas adicionais de peso molecular mais baixo na zona dos ~60 kDa (~60, ~58 e ~55 kDa) através de análise por *Immunoblotting* (Fanin *et al.* 2003, Murphy e Lamb 2009).

A análise das implicações funcionais das mutações encontradas no gene *CAPN3*, associadas à LGMD2A, permitiu sugerir que estas podem alterar a actividade proteolítica da enzima através da não ocorrência das alterações conformacionais necessárias à formação da tríade catalítica no centro activo da enzima. Por outro lado, verificou-se que algumas mutações alteram a capacidade de ligação da CAPN3 à Titina, apesar da

preservação da sua actividade (Kramerova *et al.* 2007). Fanin *et al.* (2007) mostraram ainda a perda da propriedade autolítica da CAPN3 em doentes LGMD2A com abundância normal da proteína. Resumindo, a ausência de expressão da proteína, a perda das actividades proteolítica ou autolítica e da capacidade de ligação da CAPN3 à Titina parecem ser alguns dos efeitos prováveis das mutações encontradas nos doentes LGMD2A (Fanin *et al.* 2003).

Têm vindo a ser publicados trabalhos que atribuem outras funções não proteolíticas à CAPN3, especificamente um papel na regulação e estabilização de complexos proteicos que regulam a libertação de Ca^{2+} no músculo esquelético (Protasi *et al.* 2002, Kramerova *et al.* 2008, Ojima *et al.* 2011). Estes complexos proteicos consistem em estruturas subcelulares denominadas tríades, onde os túbulos transversos (invaginações do sarcolema) comunicam com o retículo sarcoplasmático. As tríades permitem o contacto entre os canais de Ca^{2+} dos túbulos transversos sensíveis à tensão (receptores de dihidropiridina, DHPR) e os grandes canais do retículo sarcoplasmático (receptores da rianodina, RYR), permitindo a saída do Ca^{2+} deste organelo para o sarcoplasma e a subsequente contracção muscular originada em resposta a uma excitação nervosa. Associadas às tríades musculares encontram-se várias enzimas glicolíticas que interagem com esses canais de Ca^{2+} , como a Aldolase A (AldoA). Esta associação das enzimas glicolíticas com as tríades musculares poderá ser indispensável para a produção de adenosina trifosfato (ATP) necessária para a condução dos iões Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático após a excitação nervosa. Estudos experimentais demonstraram que a CAPN3 se pode ligar à AldoA, sendo a primeira indispensável para o recrutamento da AldoA para as tríades musculares (Kramerova *et al.* 2008).

A existência de interacções bioquímicas entre a CAPN3 e a DYSF foi evidenciada através de ensaios de co-imunoprecipitação (Kramerova *et al.* 2007). Esta observação, juntamente com o facto de ocorrer a diminuição recíproca da expressão destas duas proteínas em biópsias de doentes LGMD2A e LGMD2B já mencionada anteriormente, sugerem que a DYSF desempenha um papel importante na estabilização da CAPN3 e vice-versa. Simultaneamente, estes autores referiram que a CAPN3 pode também participar no processo de reparação da membrana plasmática mediado pela DYSF.

1.6 Metodologia de estudo implementada na rotina do diagnóstico molecular da LGDM2A

O diagnóstico molecular da LGMD2A foi implementado em 1998 na Unidade de Genética Molecular (UMOP) do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães (CGMJM), Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - IP (INSA).

Dado o elevado número de exões do gene *CAPN3*, a abordagem de estudo consistiu inicialmente na detecção de alterações por análise de polimorfismos de conformação em cadeia simples (SSCA) e confirmação posterior por sequenciação automática do DNA genómico (gDNA).

Actualmente, para além da sequenciação automática do gDNA realizada numa fase inicial do estudo, são efectuadas análises ao nível do RNA mensageiro (mRNA) muscular e estudos pela técnica de *Multiplex ligation-dependent probe amplification*[®] (MLPA) em gDNA, em fases posteriores. Esta segunda fase do estudo é efectuada na tentativa de identificar alterações no mecanismo de *splicing* ou que envolvem variações no número de cópias (de um ou mais exões) do gene *CAPN3*.

Na UMOP e até à presente data foram identificados molecularmente 18 doentes com LGMD2A e 3 doentes com apenas um alelo mutado detectado no gene *CAPN3*.

OBJECTIVOS

2. Objectivos

Os objectivos do presente trabalho desenvolvido em doentes com suspeita clínica ou diagnóstico clínico de Distrofia Muscular, LGMD ou LGMD2A foram os seguintes:

- 1) completar o estudo molecular realizado em doentes com apenas uma mutação em heterozigotia para detecção do segundo alelo mutado, por aplicação da técnica de MLPA e estudo do mRNA muscular, através da sequenciação de DNA complementar do mRNA (cDNA);
- 2) proceder à quantificação relativa da expressão do gene *CAPN3* em amostras musculares dos doentes através de PCR em tempo real quantitativo, por comparação com amostras controlo;
- 3) efectuar um estudo proteico muscular dos doentes baseado na determinação semi-quantitativa de proteínas musculares (por *Immunoblotting* e análise densitométrica) e no teste da actividade autolítica da CAPN3 nos doentes com abundância normal da proteína;
- 4) correlacionar todos os resultados obtidos experimentalmente, de forma a avaliar global e/ou multidisciplinarmente os doentes e de estabelecer relações genótipo/fenótipo.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição dos doentes, produtos biológicos e amostras de estudo

Neste trabalho foram estudados doentes previamente sujeitos a estudo molecular do gene *CAPN3* na UMOP do CGMJM (INSA), com pelo menos uma alteração genómica detectada em heterozigotia, e com a indicação de ter colhido biópsia muscular para análise patológica (Tabela 3.1 e Figura 3.1).

Tabela 3.1. Descrição dos doentes seleccionados para este estudo.

Doente	Sexo	Suspeita clínica/fenótipo
1	F	Distrofia Muscular
2	F	Distrofia Muscular progressiva, consanguinidade dos pais
3	F	LGMD
4	F	Distrofia Muscular progressiva
5	M	LGMD
6	F	LGMD
7	F	LGMD2A
8	F	LGMD
9	F	LGMD

Legenda: F, feminino; M, masculino.

A maioria destes doentes foi sujeita a estudos imunohistoquímicos complementares, onde se verificou a localização normal de algumas proteínas musculares, como DYSF, Sarcoglicanos, Distrofina e beta-Distroglicano (b-DG), segundo informação fornecida pelo médico que solicitou o estudo molecular do gene *CAPN3*. Em 2 desses estudos foram observadas fibras lobuladas (doentes 8 e 9). A biópsia muscular do doente 4 foi também analisada previamente por *Western blotting* (WB) num laboratório estrangeiro. No relatório dessa análise foi indicada a ausência de todas as bandas da proteína CAPN3 (~94, ~60 e ~30 kDa).

Foram utilizadas amostras de gDNA (anteriormente extraído a partir de sangue periférico), RNA total e proteínas totais (extraídos a partir de biópsia muscular) dos doentes e de controlos nos diferentes métodos abordados.

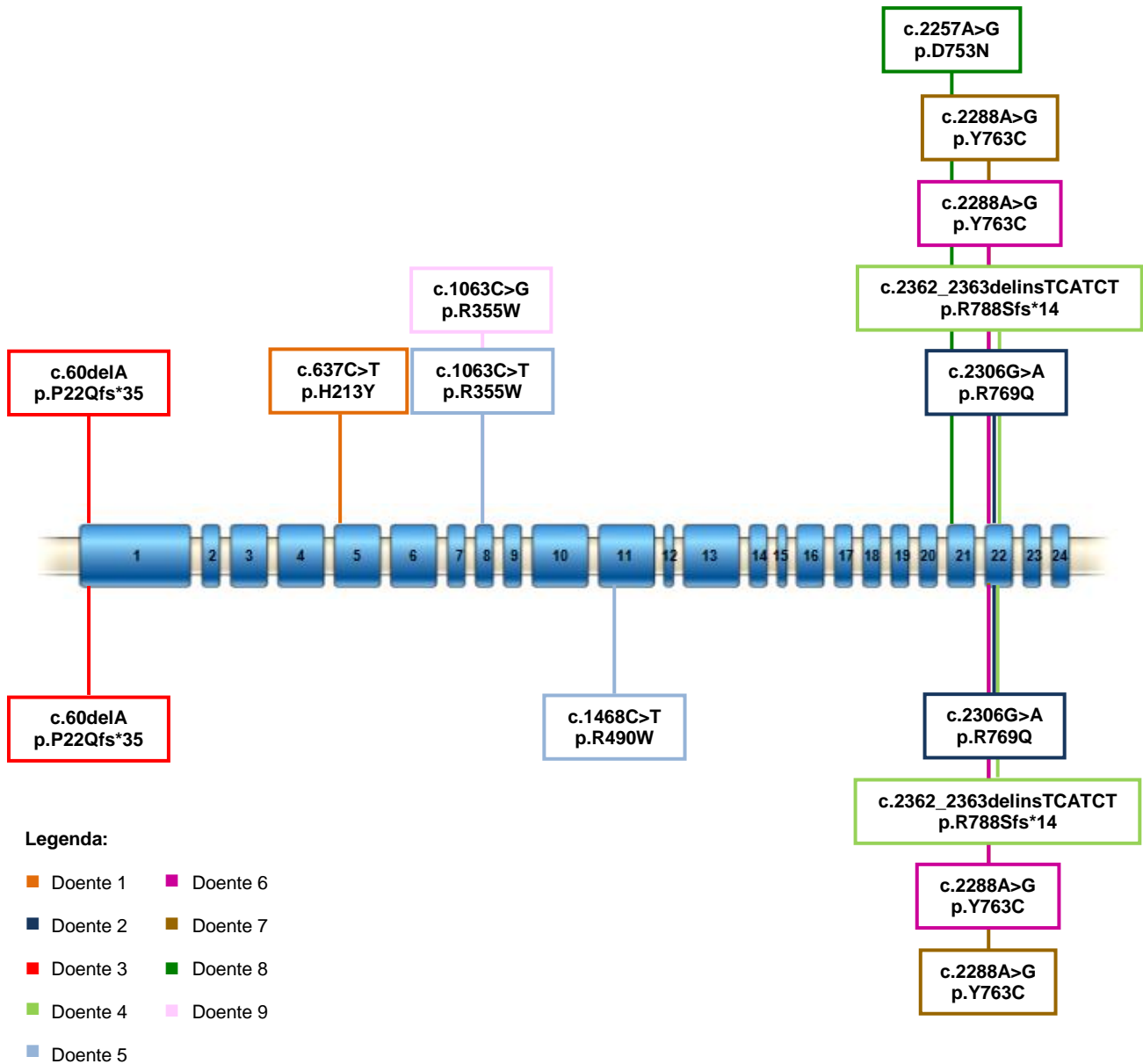


Figura 3.1. Mutações encontradas nos doentes seleccionados no presente trabalho e respectiva distribuição ao longo do gene. A cada doente corresponde uma cor, conforme está indicado na legenda. Existem doentes que apresentam uma (heterozigotia simples) ou duas mutações (heterozigotia composta e homozigotia). O gene CAPN3 está representado pela barra horizontal, em que os rectângulos azuis numerados simbolizam os exões. Nomenclatura usada de acordo a *Human Genome Variation Society* (HGVS, <http://www.hgvs.org>). Sequência de referência do gene CAPN3 utilizada: NM_000070.2.

3.2 Extracção de RNA total de músculo

Foi extraído RNA total a partir de 10 a 40 mg de biópsia muscular de doentes e de controlos através do Kit comercial *PerfectPure™ RNA Cell & Tissue* (5 Prime®), seguindo as instruções do fabricante. Todos os reagentes, colunas e tubos utilizados estão incluídos no Kit.

Cada biópsia muscular foi homogeneizada manualmente em 400 µl de *Lysis Solution* suplementada com 4 µl de Tris 2-carboxietil fosfina (TCEP), mantendo o homogeneizador de vidro em gelo. Após a homogeneização, foram adicionados 10 µl de *Proteinase K Solution* ao homogeneizado. Depois da agitação no vórtex, esta mistura foi incubada em gelo durante 10 minutos.

No final desta incubação, o homogeneizado foi colocado numa *Preclear Column* para remoção de material não homogeneizado e centrifugado a 400 x g durante 2 minutos. A coluna foi rejeitada, o homogeneizado foi colocado numa *Purification Column* e centrifugado a uma velocidade de 16000 x g durante 2 minutos. No final deste processo, esta coluna foi colocada num tubo colector novo, adicionou-se 400 µl de *Wash 1 Solution* para lavagem da coluna e centrifugou-se novamente a 16000 x g durante 1 minuto.

No final da centrifugação, procedeu-se à transferência da coluna para um tubo colector novo e juntou-se 50 µl de *DNase Solution* à coluna, deixando-se incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente para degradação de DNA contaminante. No final do tempo de incubação, a coluna foi lavada com 200 µl de *DNase Wash Solution* e submetida a uma centrifugação de 16000 x g durante 1 minuto, repetindo-se este passo uma segunda vez, com um tempo de centrifugação de 2 minutos.

Procedeu-se, seguidamente, à transferência da coluna para um novo tubo colector, à adição de 200 µl de *Wash 2 Solution* e à centrifugação a uma velocidade de 16000 x g durante 1 minuto. Lavou-se novamente a coluna com 200 µl de *Wash 2 Solution* e procedeu-se a uma nova centrifugação à mesma velocidade, no entanto, durante 2 minutos.

Por último, a coluna foi transferida para um novo tubo colector, adicionou-se 50 µl de *Elution Solution* e procedeu-se à centrifugação durante 1 minuto a 16000 x g para eluição do RNA total.

Finalizado o procedimento de extracção, determinou-se a concentração e verificou-se a qualidade do RNA total, utilizando o espectrofotómetro NanoDrop® e armazenaram-se as amostras a -20 °C.

3.3 Análise de cDNA muscular do gene *CAPN3* por sequenciação

Síntese de cDNA total de músculo e amplificação por RT-PCR

A conversão de RNA total de músculo em cDNA total e a amplificação dos subfragmentos de cDNA pretendidos do gene *CAPN3* foram efectuadas num só passo por transcrição reversa e amplificação por PCR (RT-PCR), utilizando o Kit *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. Este Kit é constituído por todos os reagentes necessários, com excepção dos *primers*, oligonucleótidos iniciadores complementares das sequências flanqueadoras da região de cDNA a amplificar.

O cDNA da *CAPN3* de doentes e controlos foi amplificado em 4 fragmentos mais pequenos, utilizando 4 pares de *primers* flanqueadores específicos (Tabela 3.2). Cada reacção de RT-PCR foi preparada da seguinte forma:

25 µl *2X Reaction Mix*,
1 + 1 µl *primers* (F e R) 10 pmol/µl,
1 µl *RT/Platinum® Taq Mix*,
1 µl RNA total (músculo) 100 ng/µl,
21 µl dH₂O (sem nucleases).

A mistura de reacção foi depois colocada num termociclador apropriado e submetida ao seguinte programa de temperaturas constituído por duas fases distintas. Na primeira fase, ocorreu conversão do RNA total em cDNA total através de incubação a 50 °C durante 30 minutos. Numa segunda fase, ocorreu amplificação do cDNA da *CAPN3* com início num passo de desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C e 40 segundos a 72 °C, finalizando num passo de extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

A ocorrência de amplificação dos 4 fragmentos foi verificada por electroforese em gel de agarose.

Seguidamente, procedeu-se à preparação dos fragmentos amplificados para sequenciação através do tratamento enzimático com a mistura *ExoSAP-IT*[®], constituída por exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão (USB). Este tratamento enzimático permite degradar os *primers* não utilizados e desfosforilar os dNTP não incorporados na reacção de RT-PCR. Neste procedimento, adicionou-se 2 µl de *ExoSAP-IT*[®] a 5 µl de produtos amplificados e submeteu-se a mistura a uma temperatura de 37 °C durante 30 minutos e, de seguida, a uma temperatura de 85 °C durante 15 minutos para inactivação das enzimas num termociclador adequado.

Tabela 3.2. Descrição dos *primers* utilizados na amplificação de cDNA do gene *CAPN3* por RT-PCR (Richard e Beckmann, 2001).

Nome dos <i>Primers</i>	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Nucleótidos abrangidos	Sequência nucleotídica 5'-3'
mCAPN3 1-4F/R	696	-189_-170	F: CAG CTC GGT TTT TAA GAT GG
		507_526	R: CGT CCA CCC ACT CTC CAT AG
mCAPN3 2-10F/R	914	341_360	F: ATG GAG CCA ACA GAA CTG AC
		1254_1235	R: GGC CGT GAG GTT GCA GAT CT
mCAPN3 8-16F/R	759	1085_1104	F: AGG TGG AGT GGA ACG GTT CT
		1843_1824	R: GCT CCT TGT TGC TGT TTG CT
mCAPN3 14-24F/R	869	1751_1770	F: TTG AAA ATA CCA TCT CCG TG
		2619_2600	R: GGG GTA AAA TGG AGG AGG AA

Legenda: F, *forward*; R, *reverse*. pb, pares de bases. Numeração dos nucleótidos de acordo com sequência de referência NM_000070.2.

Reacção de sequenciação e análise da sequência de cDNA do gene *CAPN3*

As reacções de sequenciação foram realizadas usando o Kit comercial *Big Dye Terminator v.1.1* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram efectuadas duas reacções de sequenciação para cada um dos 4 fragmentos de cDNA sintetizados da CAPN3, em cada um dos sentidos. Em cada reacção de sequenciação foram misturados:

7 µl produto do RT-PCR tratado com *ExoSAP-IT*[®],

2 µl *primer* (F ou R) 2,5 pmol/µl (Tabela 3.2),

1 µl *Big Dye Terminator* v.1.1 (constituído por MgCl₂, dNTP, ddNTP marcados com fluorocromos e AmpliTaq DNA polymerase).

Esta mistura foi depois sujeita ao seguinte ciclo de temperaturas num termociclador apropriado, que incluiu uma desnaturação inicial de 96 °C durante 1 minuto, seguido de 27 ciclos a 96 °C durante 10 segundos, 50° C durante 45 segundos e 60 °C durante 1 minuto e 15 segundos, terminando num passo de extensão final a 60 °C durante 5 minutos.

A purificação dos produtos resultantes das reacções de sequenciação foi efectuada através de um sistema comercial de filtração em gel em placas de 96 poços (PERFORMA[®] DTR Ultra 96-Well Plates, EdgeBio), de acordo as instruções do fabricante. Este procedimento permite a remoção de ddNTP e dNTP não incorporados na reacção de sequenciação, assim como sal e outros componentes de baixo peso molecular. Depois de remover o tampão de hidratação do gel de cada poço por centrifugação, os produtos das reacções de sequenciação foram colocados no centro do gel de cada poço e a placa centrifugada novamente a 850 x g durante 5 minutos. Os produtos eluidos numa placa nova foram depois sujeitos a electroforese capilar num analisador automático (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Os dados obtidos foram exportados para o *software* SeqScape[®] (Applied Biosystems) para leitura e análise da sequência nucleotídica (sequência de referência NM_000070.2).

3.4 Detecção de alterações no gene CAPN3 por MLPA

A técnica de MLPA (<http://.mlpa.com>, MRC-Holland) foi realizada na tentativa de identificar um segundo alelo mutado no gene CAPN3 nos doentes em que apenas foi encontrada uma mutação em heterozigotia, após o estudo molecular realizado na UMOP. Esta técnica permite detectar variações do número de cópias em simultâneo de

diferentes sequências genómicas, a partir da hibridação de sondas MLPA complementares dessas sequências, e subsequente amplificação das sondas por PCR em *multiplex* utilizando *primers* universais. Os fragmentos amplificados são sujeitos a electroforese capilar e os perfis de picos obtidos comparados com os dos controlos.

Neste trabalho foi utilizado o Kit disponibilizado comercialmente para estudo do gene *CAPN3* (SALSA MLPA KIT P176-B1 CAPN3), seguindo o protocolo do fabricante, na presença de gDNA (extraído a partir de sangue periférico) dos doentes candidatos e de 5 controlos. As diferentes temperaturas de incubação, assim como a reacção de PCR, foram asseguradas com o uso de um termociclador apropriado.

Inicialmente, procedeu-se à diluição das amostras de gDNA a 30 ng/μl (num volume final de 5 μl) e à sua desnaturação a 98 °C durante 5 minutos. Adicionou-se de seguida 1,5 μl de *SALSA probemix* e 1,5 μl de *MLPA buffer* a cada amostra, homogeneizou-se com cuidado e deixou-se incubar 1 minuto a 95 °C, seguido de 16 a 18 horas a 60 °C para hibridação das sondas MLPA (duas sondas complementares por cada exão do gene *CAPN3*) com o gDNA previamente desnaturado.

Findo o tempo de incubação, reduziu-se a temperatura do termociclador para 54 °C e adicionou-se a cada amostra 3 μl de *Ligase-65 buffer A*, 3 μl de *Ligase-65 buffer B*, 25 μl de dH₂O (sem nucleases) e 1 μl de *Ligase-65*. Para ocorrência de ligação entre as sondas MLPA (relativas ao mesmo exão), as misturas de ligação foram colocadas 15 minutos a 54 °C e depois 5 minutos a 98 °C. No final desta incubação, as misturas foram colocadas à temperatura ambiente.

Finalmente, para a amplificação das sondas ligadas utilizando *primers* universais, colocaram-se em tubos novos: 4 μl de *SALSA PCR buffer*, 26 μl de dH₂O (sem nucleases) e 10 μl do produto das misturas de ligação anterior. Os novos tubos foram colocados no termociclador a 60 °C, adicionando-se a cada um 2 μl de *Salsa PCR-primers*, 2 μl de *SALSA Enzyme Dilution buffer*, 5,5 μl de dH₂O (sem nucleases) e 0,5 μl de *SALSA Polymerase*. Processou-se a reacção de PCR nas seguintes condições: 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 1 minuto, e extensão final a 72 °C durante 20 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados por electroforese capilar no analisador automático 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

A análise dos picos relativos a cada sonda foi realizada após exportação dos dados para o *software* GeneMarker® (SoftGenetics LLC).

Na análise informática do MLPA foi efectuada inicialmente uma normalização intra-amostra, em que a intensidade dos picos relativos à amplificação de cada uma das sondas foi dividida pela intensidade combinada dos picos de todas as sondas (normalização populacional). As razões intra-normalizadas de cada sonda foram depois divididas pela média das razões intra-normalizadas de todos os controlos (normalização inter-amostra), calculando-se uma razão final para cada sonda por amostra (quociente de dosagem; QD).

Na análise anterior, os dados dos doentes e controlos foram utilizados na construção de uma recta de regressão linear baseada numa distribuição T com um intervalo de confiança de 99 %.

A interpretação dos resultados foi efectuada utilizando os valores calculados dos QD como indicativos de alterações do número de cópias dos exões analisados, de acordo com a Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Interpretação dos valores de QD com indicação de alterações no número de cópias das sequências genómicas em estudo (<http://www.mlpa.com>).

Número de cópias	Quociente de dosagem
Delecção	$<0,7$
Normal	$0,7 \leq QD \leq 1,2$
Duplicação	$\geq 1,3$

3.5 Quantificação relativa da expressão do gene *CAPN3* através de PCR em tempo real

Síntese de cDNA total de músculo por transcrição reversa

A reacção de transcrição reversa foi efectuada com o Kit disponibilizado comercialmente *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), a partir de RNA total extraído de biópsias musculares de doentes e controlos.

As reacções foram preparadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada amostra foi preparada a seguinte mistura de reacção:

5 µl 10X RT-Buffer,
2 µl 100 mM dNTP Mix,
5 µl RT-Primer,
2,5 µl MultiScribe Reverse Transcriptase,
10,5 µl dH₂O (sem nucleases),
25 µl RNA total (músculo).

As misturas foram submetidas a 20 °C durante 10 minutos, seguido de 2 horas a 37 °C e, por fim, 5 minutos a 85 °C, num termociclador apropriado. O cDNA total sintetizado foi depois usado nas reacções de PCR em tempo real quantitativo.

PCR em tempo real e quantificação relativa de expressão génica

A determinação da expressão do gene *CAPN3* foi efectuada através de PCR em tempo real quantitativo com base nas diferenças de expressão entre os doentes e controlos usados, utilizando o método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak e Schmittgen 2001) disponibilizado pelo *software* associado ao equipamento de PCR em tempo real usado.

Este estudo foi realizado usando o equipamento de PCR em tempo real 7500 Fast da Applied Biosystems, seguindo as instruções do manual do equipamento.

Cada reacção de PCR em tempo real foi preparada adicionando os seguintes componentes:

1 µl sonda *TaqMan*[®],
10 µl *TaqMan Gene Expression Master Mix*,
cDNA total (músculo),
dH₂O (sem nucleases) para perfazer volume final de 20 µl.

As misturas de reacção foram depois colocadas no equipamento para se proceder à reacção de PCR em tempo real.

Nesta metodologia foram utilizadas duas sondas *TaqMan*[®] (Applied Biosystems) que reconhecem duas localizações distintas no cDNA humano da CAPN3: Hs00544982_m1 e Hs01115988_m1 (junto à junção dos exões 23-24 e 5-6, respectivamente). Foi ainda usada uma terceira sonda (4326317E-0711020) complementar que reconhece o exão 3 do cDNA humano da Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizado como controlo endógeno.

Em todos os ensaios foram efectuadas réplicas das reacções de PCR em tempo real de forma a minimizar os erros experimentais.

Numa primeira experiência, começou-se por avaliar a eficiência de amplificação das regiões a estudar, efectuando 3 reacções de PCR em tempo real individuais para cada uma das sondas (*singleplex*) ou amplificações simultâneas dos genes *CAPN3* e *GAPDH* (*duplex*), usando a mesma amostra de cDNA controlo. No final, foram analisadas as curvas de amplificação e verificadas as diferenças na eficiência de amplificação através dos valores de ΔRN , que corresponde à intensidade de fluorescência normalizada em função da fluorescência residual (*baseline*).

Seguidamente, procedeu-se à validação do método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$), realizando a seguinte experiência: amplificação de diferentes quantidades de cDNA obtido a partir de amostras musculares normais (2,5, 5, 10 e 20 ng) por PCR em tempo real *singleplex*. Para cada concentração de cDNA foi calculado o valor do *threshold cycle* (C_T) médio dos C_T obtidos para cada uma das duas réplicas realizadas e posterior análise por regressão linear. O C_T corresponde ao número mínimo do ciclo a partir do qual tem início a fase de crescimento exponencial da reacção de amplificação.

Após optimização e validação do método, as três sondas foram testadas em reacções *singleplex* em duplicado, na presença de 5 ng de cDNA muscular dos doentes e controlos.

Na análise informática final das quantidades relativas de expressão genica, foram calculados C_T médios e desvios padrão (SD) associados para cada amostra. Estes valores foram corrigidos em função do controlo endógeno, determinando-se os valores de ΔC_T ($C_{T,CAPN3} - C_{T,GADPH}$) e respectivo SD. Os valores de $\Delta \Delta C_T$ (e respectivo SD) foram depois determinados, efectuando a diferença entre os ΔC_T de todas as amostras e o controlo normal 5, que foi considerado aquele que apresenta maior expressão do gene *CAPN3* entre os controlos usados (a partir do valor de ΔC_T respectivo). As quantidades relativas de expressão (RQ) das amostras foram finalmente determinadas pela aplicação da fórmula $2^{-\Delta \Delta C_T}$ (ou $2^{-\Delta \Delta C_T \pm SD}$ se for considerado o SD associado), considerando RQ=1 para o controlo 5. Os valores de RQ foram apresentados graficamente em função da amostra analisada.

3.6 Estudo proteico muscular: análise semi-quantitativa de proteínas musculares e teste da actividade autolítica da CAPN3

Preparação e determinação da concentração de proteína total muscular para análise por Western blotting

Um fragmento (<20 mg) de biópsia muscular armazenada a -70 °C (de doentes e controlos) foi rapidamente cortado, pesado e colocado em 62,5 volumes de tampão de homogeneização (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (m/v) SDS, 4 M ureia, 10 % (v/v) 2-mercaptoetanol e 1:500 de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos (Sigma)), na tentativa de se evitar a sua descongelação. Este fragmento em tampão de homogeneização foi posteriormente sonificado para auxiliar à “dissolução” do tecido muscular. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, o homogeneizado foi sujeito a precipitação com ácido tricloroacético (TCA) para concentração da proteína total muscular.

A determinação da concentração proteica nos homogeneizados musculares foi realizada pelo método de Bradford, utilizando o ensaio comercial da BioRad (*BioRad Protein Assay*). A albumina sérica bovina (BSA) foi a proteína padrão usada para a elaboração da curva padrão. Diferentes quantidades de BSA e de homogeneizado muscular foram diluídos em dH₂O (volume final de 800 µl). Em seguida, adicionou-se 200

μl de *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* a cada tubo e agitou-se no vórtex. Após incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, foi medida a absorvância a 595 nm (corrigidos pelo “Branco”). Foi construída a curva padrão a partir dos valores de absorvância obtidos para a BSA, em função da sua concentração, e determinada a equação da recta que serviu para o cálculo da concentração proteica muscular dos doentes.

Western blotting

A proteína total muscular foi separada por electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Foi utilizado o sistema de electroforese *Novex®* da Invitrogen com géis de gradiente *NuPAGE® Novex® Midi Bis-Tris 4-12 %* em conjunto com o tampão de corrida *NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (1x)*. Além deste tampão, foram ainda usados os seguintes tampões incluídos no Kit comercializado: *NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)*, *NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)* e *NuPAGE® Antioxidant*. Foi seguido o manual da tina de electroforese e a brochura técnica dos géis *Novex®* fornecidos pelo fabricante no procedimento do SDS-PAGE.

Após precipitação com TCA, o *pellet* de proteína total muscular foi dissolvido na presença de tampão *NuPAGE® LDS Sample Buffer (1x)* suplementado com *NuPAGE® Sample Reducing Agent (1x)* por aquecimento a 70 °C durante 10 minutos. Depois de uma breve centrifugação, o equivalente a 100 μg de proteína total muscular foi aplicada por poço, juntamente com 2 padrões proteicos de peso molecular: *MagicMark™ XP Western Protein Standard* (Invitrogen) e *SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range* (BioRad). A corrida de electroforese foi efectuada nas condições recomendadas: voltagem constante igual a 200 V durante 55 minutos, à temperatura ambiente, na presença de *NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (1x)*, suplementado com 435 μl de *NuPAGE® Antioxidant (1x)* apenas no cátodo (reservatório superior da tina), para manutenção das proteínas reduzidas durante a corrida.

A transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose decorreu num sistema de transferência do tipo *wet blot transfer*, de acordo com as indicações do fabricante (BioRad). A transferência decorreu durante a noite a uma voltagem constante de 35 V, tendo o tampão (0,6 % (m/v) Tris, 2,88 % (m/v) glicina, 0,01 % (m/v) SDS e 20 %

(v/v) metanol) do tanque sido mantido refrigerado por ligação a um banho com circulação, programado à temperatura de 4 °C.

O sucesso da transferência foi verificado por coloração da membrana de nitrocelulose com 0,2 % (m/v) *Ponceau S*, 0,1 % (v/v) ácido acético (e descoloração com dH₂O), enquanto que o gel *post-blotted* foi corado com 0,115 % (m/v) *Coomassie-blue R250*, 25 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ácido acético (e descorado com 10 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ácido acético).

Imunodeteccção com anticorpos monoclonais específicos

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 5 % (m/v) leite em pó em *Tris-Buffered Saline Tween-20* (TBST) durante 1 hora à temperatura ambiente.

As membranas bloqueadas foram depois incubadas, durante a noite a 4 °C, com os seguintes anticorpos primários monoclonais produzidos em ratinho (Novocastra), diluídos numa solução de 5 % (m/v) leite em pó em TBST:

- anticorpo *NCL-CALP-2C4* (diluição final de 1:40) produzido contra os aminoácidos 1-19 (exão 1) da proteína humana CAPN3, que reconhece a banda de ~94 kDa relativa à proteína *full-length* e um fragmento adicional de ~30 kDa;

- anticorpo *NCL-CAPN3-12A2* (diluição final de 1:40) produzido contra os aminoácidos 355-370 (exão 8) da proteína humana CAPN3, que reconhece além da banda de ~94 kDa, fragmentos adicionais de ~60 kDa;

- anticorpo *NCL-Hamlet* (diluição final de 1:2750) produzido contra os aminoácidos 1999-2016 da proteína humana DYSF, que reconhece uma banda de ~230 kDa;

- anticorpo *NCL-b-DG* (diluição final de 1:1000), produzido contra os últimos 15 aminoácidos da extremidade C-terminal do b-DG humano, usado como controlo muscular interno, que reconhece uma banda de ~43 kDa.

Depois de 3 lavagens de 15 minutos das membranas com TBST, estas foram sujeitas a uma segunda incubação com um anticorpo secundário conjugado com a HRP (*goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate*, Santa Cruz Biotechnology)

diluído (1:25000) em 5 % (m/v) leite em pó em TBST, durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após repetição das lavagens anteriores com TBST, as bandas proteicas foram detectadas usando um sistema quimioluminescente comercial (*SuperSignal Chemiluminescent Substrate*, Pierce Products, Thermo Scientific). O sinal quimioluminescente foi adquirido através do equipamento de aquisição de imagem LAS-3000 (Fujifilm).

Análise semi-quantitativa da abundância da CAPN3 e DYSF musculares

A determinação semi-quantitativa da abundância da CAPN3 e da DYSF nos homogeneizados totais de músculo foi realizada por análise densitométrica das bandas proteicas detectadas nos *immunoblots*, utilizando o *software* Multi-Gauge (Fujifilm) associado ao equipamento de aquisição de imagem. Nesta análise, a quantidade de proteína total muscular aplicada por cada amostra foi normalizada em função da banda de Miosina (MIO) não transferida no gel *post-blotted*, corado com *Coomassie-blue R250*. A abundância das bandas proteicas dos doentes foi comparada com os controlos e calculada como percentagem destes. Os valores finais obtidos foram apresentados de acordo com a seguinte nomenclatura: ausência total (-), abundância normal (+) e abundância superior ao normal (++)

Teste da actividade autolítica da CAPN3

Um fragmento (<20 mg) de biópsia muscular armazenada a -70 °C (de doentes e controlos) foi rapidamente cortado, pesado e colocado em 62,5 volumes de 0,9 % (m/v) NaCl, na tentativa de se evitar a sua descongelação. Este fragmento em tampão salino foi posteriormente sonificado para auxiliar à “dissolução” do tecido muscular. Foram retiradas aliquotas aos tempos 0, 5, 10, 20 e 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, para posterior precipitação com TCA para concentração da proteína total muscular, como descrito anteriormente.

A análise da actividade autolítica da CAPN3 foi efectuada após WB e imunodeteção com o anticorpo anti-CAPN3, que reconhece a forma *full-length*, assim como o fragmento adicional de ~60 kDa, segundo o protocolo descrito previamente. Esta análise é baseada na alteração do perfil das bandas proteicas de ~94 e ~60 kDa da CAPN3 ao longo do tempo total de incubação, em comparação com o perfil das amostras controlo. Segundo Fanin *et al.* (2003), no caso da CAPN3 com actividade autolítica normal, a banda de ~94 kDa desaparece quase na sua totalidade logo após 5 minutos de incubação em tampão salino, surgindo progressivamente bandas com peso molecular na ordem dos ~60 kDa, que correspondem a subprodutos da forma *full-length* da CAPN3 (com ~55, ~58 e ~60 kDa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de novas alterações

No grupo de indivíduos estudados foram incluídos 3 doentes (1, 8 e 9) com apenas um alelo mutado no estado heterozigótico, identificado por sequenciação automática do gDNA respectivo. Dada a suspeita clínica de Distrofia Muscular, LGMD ou LGMD2A, o primeiro objectivo deste trabalho consistiu na tentativa de identificar um segundo alelo mutado através de outras técnicas moleculares: estudo do mRNA (para rastrear possíveis mutações intrónicas susceptíveis de introduzir alterações no mecanismo de *splicing*) e aplicação da técnica de MLPA (para pesquisar a presença de deleções e/ou duplicações no gene *CAPN3*). Nascimbeni *et al.* (2010) estimaram a frequência de alterações intrónicas associadas a este gene como correspondendo a ~15 % de todas as mutações detectadas.

O estudo do RNA dos doentes 1 e 9 foi realizado para rastreio de novas mutações capazes de interferir com os mecanismos de transcrição e *splicing*. Este estudo consistiu na conversão do RNA total dos doentes em cDNA total e posterior amplificação do cDNA do gene *CAPN3* por RT-PCR. Os subfragmentos de cDNA amplificados foram depois sujeitos a análise por sequenciação automática.

Em ambos os doentes, apenas se confirmou a presença das alterações previamente identificadas após análise do gDNA: r.637c>u no doente 1 (Figura 4.1A) e r.1063c>g no doente 9 (Figura 4.1B), ambas em heterozigotia.

O doente 8 não foi estudado por esta metodologia, uma vez que não foi possível obter quantidade suficiente de RNA total muscular para se proceder à reacção de transcrição reversa.

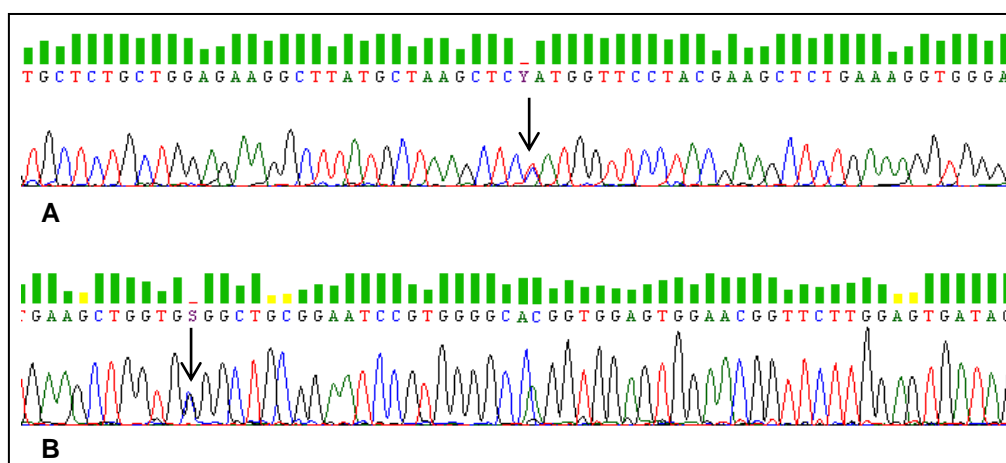


Figura 4.1. Alterações detectadas após análise da sequência de cDNA do gene *CAPN3* dos doentes 1 (A) e 9 (B). As setas indicam as mutações r.637c>u (A) e r.1063c>g (B), ambas em heterozigotia. Nomenclatura usada de acordo com a HGVS. Sequência de referência do gene *CAPN3* utilizada: NM_000070.2.

A técnica de MLPA foi utilizada com a finalidade de detectar a presença de alterações no número de cópias dos diferentes exões codificantes do gene *CAPN3*, nomeadamente a presença de deleções ou duplicações envolvendo um ou mais exões, na presença de gDNA dos doentes (1, 8 e 9) e de 5 controlos. A Figura 4.2 constitui um exemplo da análise informática dos dados obtidos com o *software* GeneMarker®.

A Figura 4.2A corresponde ao electroferograma de separação dos picos relativos às diferentes sondas usadas após electroforese capilar, quer do doente, quer das amostras controlo. Após análise de regressão linear dos picos obtidos, verifica-se a relação dos dados normalizados para cada sonda entre o doente e a média dos controlos, assim como o SD obtido no ensaio que deve ser inferior a 10 % (Figuras 4.2B e 4.3). Na tabela mostrada na Figura 4.2C é indicado o nome das sondas usadas (*Probe Name*), o tamanho dos picos respectivos (*Bin Size*) e os QD calculados após a análise informática final dos dados.

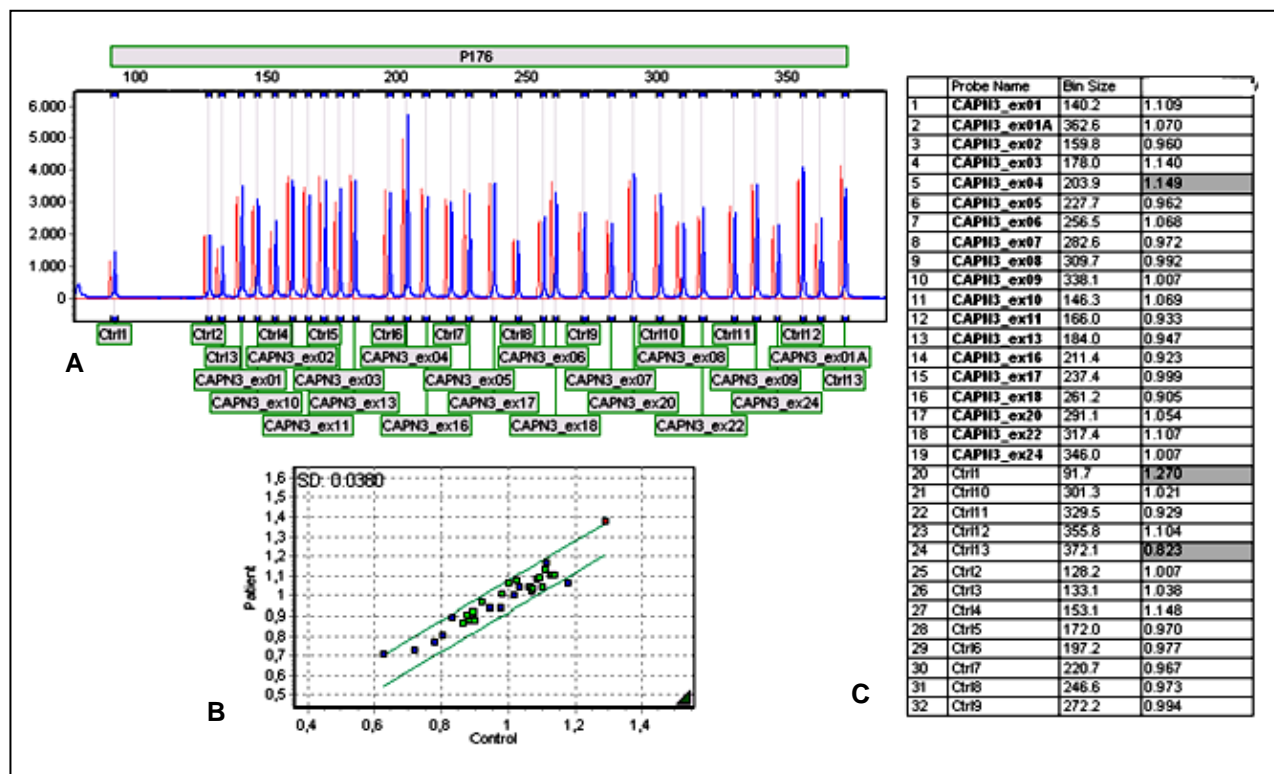


Figura 4.2. Exemplo de resultado obtido com a técnica de MLPA a partir do gDNA de um dos doentes analisados (doente 1). **A** - Electroferograma que representa as unidades de intensidade de fluorescência relativa a cada pico em função do seu tamanho (nt), onde se visualizam os picos do doente (a cor azul) e da média dos controlos (a cor vermelha). **B** - Análise de regressão linear, onde se relacionam os dados obtidos para o doente (*Patient*) e a média dos controlos (*Control*) para cada uma das sondas usadas, e respectivo SD. **C** - Tabela com informação relativa a cada uma das sondas: nome (*Probe Name*), tamanho do pico (*Bin Size*) e valor dos QD.

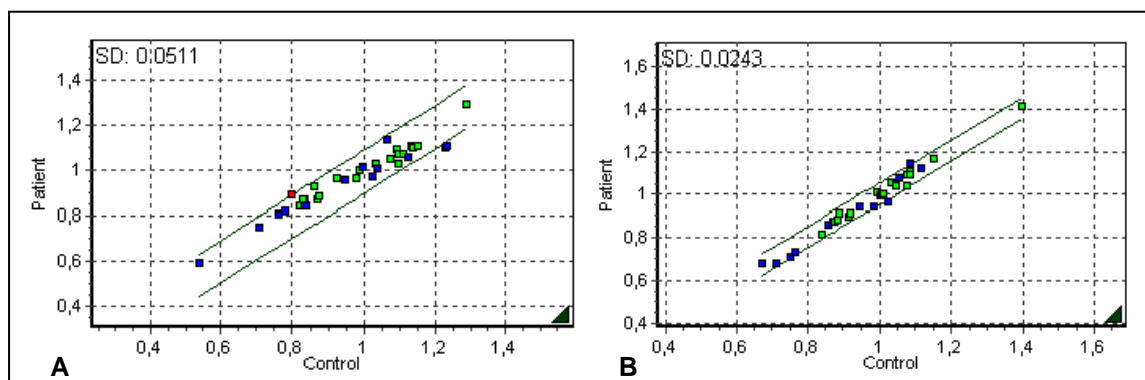


Figura 4.3. Análise de regressão linear dos dados de MLPA dos doentes 8 (**A**) e 9 (**B**).

Em nenhum dos doentes analisados foi encontrada qualquer alteração no número de cópias dos diferentes exões do gene *CAPN3* avaliados por MLPA, uma vez que os QD para cada sonda encontraram-se dentro do intervalo esperado (Tabela 3.3).

Logo, o estudo do mRNA e a análise por MLPA dos doentes 1, 8 e 9 não permitiram identificar novos alelos mutados no gene *CAPN3*, não tendo sido possível confirmar molecularmente o diagnóstico de LGMD2A.

4.2 Estudo da expressão do gene *CAPN3*

A expressão do gene *CAPN3* foi avaliada utilizando o método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) por PCR em tempo real quantitativo.

Este método de quantificação relativa permite analisar diferenças de expressão génica de amostras em estudo relativamente a um grupo de amostras controlo.

A análise da expressão do gene *CAPN3* foi efectuada utilizando 2 sondas *TaqMan*[®] (Applied Biosystems) que reconhecem o gene humano em duas regiões distintas: Hs00544982_m1 (*CAPN3* A) e Hs01115988_m1 (*CAPN3* B). Foi ainda utilizada uma terceira sonda que reconhece o gene *GAPDH* humano, como controlo endógeno do ensaio.

Assim, neste estudo, começou-se por otimizar e validar o método escolhido de forma a aproximar as eficiências de expressão dos genes *CAPN3* e *GAPDH*, através das experiências a seguir discriminadas.

Numa primeira experiência, a eficiência de amplificação das regiões a estudar (*CAPN3* e *GAPDH*) foi testada da seguinte forma: os dois genes foram amplificados em reacções de PCR em tempo real independentes (*singleplex*) ou na mesma reacção (*duplex*), na presença das respectivas sondas e a partir da mesma quantidade de cDNA total controlo (Figura 4.4).

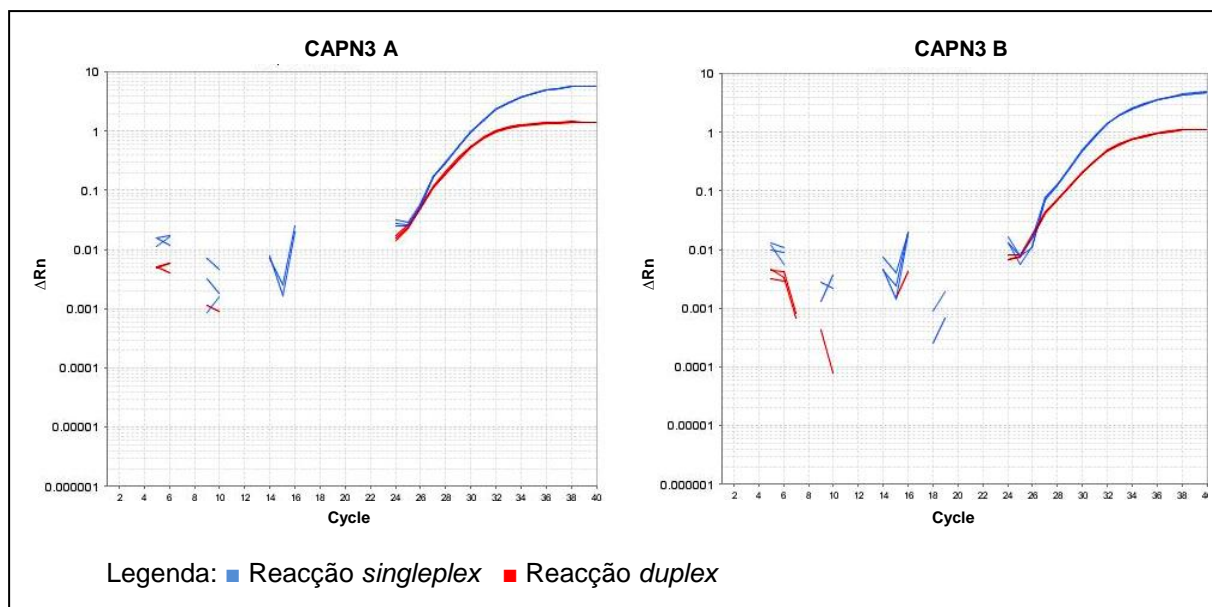


Figura 4.4. Curvas das reacções de amplificação *singleplex* e *duplex* de um cDNA controlo para as sondas CAPN3 A e CAPN3 B. As curvas referentes às reacções *singleplex* e *duplex* foram identificadas pelas cores azul e vermelho, respectivamente. ΔR_n , intensidade de fluorescência normalizada em função da fluorescência residual; *Cycle*, número do ciclo da reacção de PCR em tempo real.

Após análise da curva de amplificação, verificou-se que na reacção *singleplex* há uma maior eficiência de amplificação ($>\Delta R_n$) do gene *CAPN3*, comparativamente ao que acontece nas reacções *duplex*. Perante este resultado, nos ensaios realizados para este estudo foram efectuadas reacções *singleplex*.

Numa segunda experiência, analisou-se a aplicabilidade do método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) na gama linear da curva de amplificação dos genes em estudo. Neste sentido, verificou-se a variação do C_T médio (considerando as réplicas efectuadas) em função do logaritmo da quantidade de cDNA total, na amplificação de uma amostra controlo. Os dados obtidos foram sujeitos a análise de regressão linear através da elaboração da respectiva linha de regressão semi-logarítmica (C_T médio em função de $\log [cDNA]$) e do cálculo do valor de correlação linear (R^2) (Figura 4.5).

Os gráficos obtidos mostraram a linearidade existente entre os valores de C_T calculados e as diferentes concentrações de cDNA total, também demonstrada pelos valores obtidos para R^2 (iguais a ~ 1).

Logo, as duas experiências anteriormente descritas demonstraram a aplicabilidade do método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) na avaliação de diferenças de expressão muscular do gene *CAPN3*, entre os doentes analisados no presente estudo e amostras controlo.

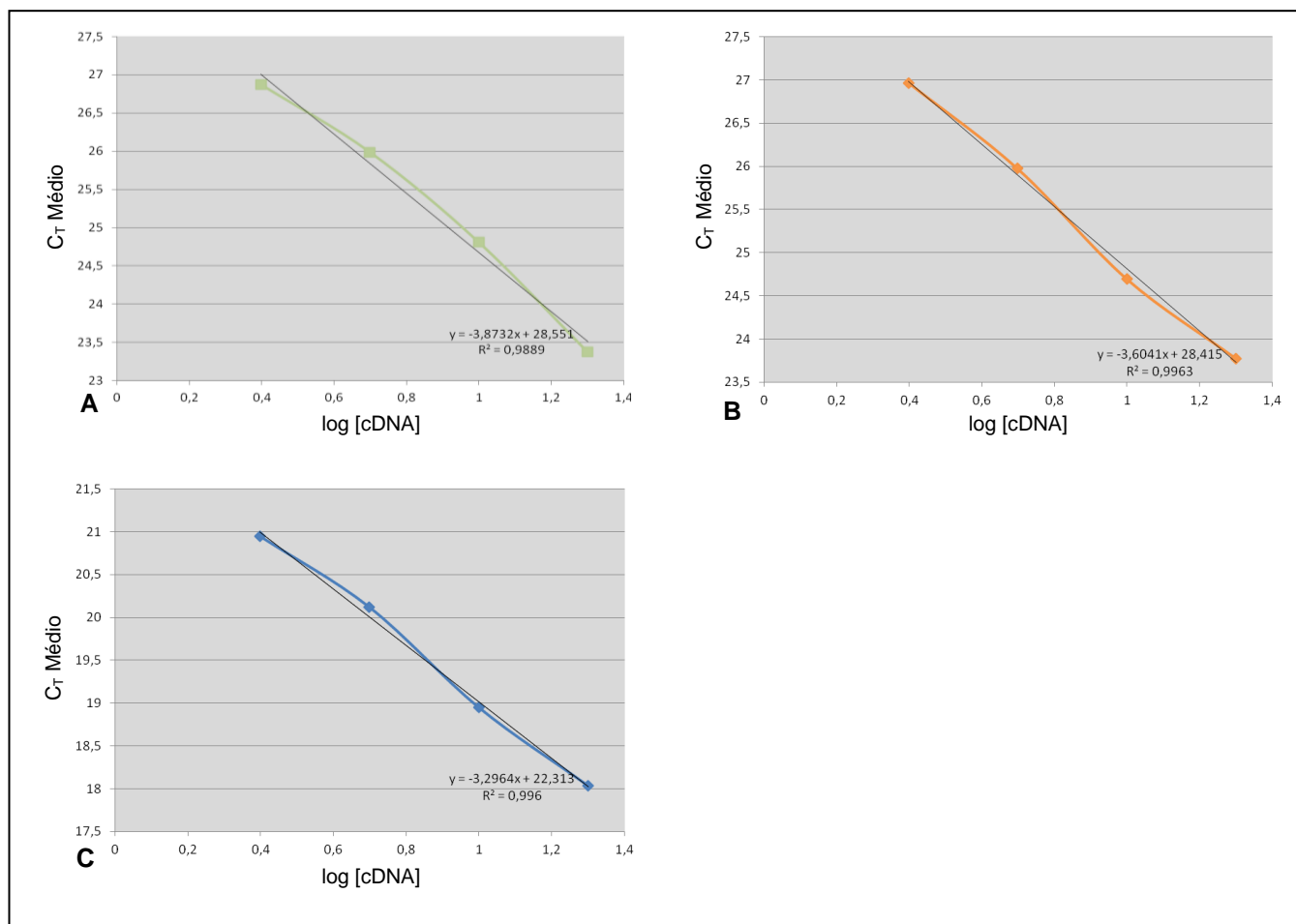


Figura 4.5. Rectas de regressão obtidas para avaliar a linearidade da amplificação de uma amostra de cDNA controlo (em diferentes concentrações), a partir das 3 sondas em estudo. **A** - CAPN3 A; **B** - CAPN3 B; **C** - GAPDH.

Seguidamente, procedeu-se à determinação da expressão do gene *CAPN3* nos doentes 1, 2, 4, 8 e 9 e em 5 amostras controlo, através de reacções de PCR em tempo real *singleplex* na presença de 5 ng de cDNA total muscular.

A Figura 4.6 mostra um exemplo de cada um dos diferentes perfis de amplificação obtidos entre o grupo de amostras analisadas.

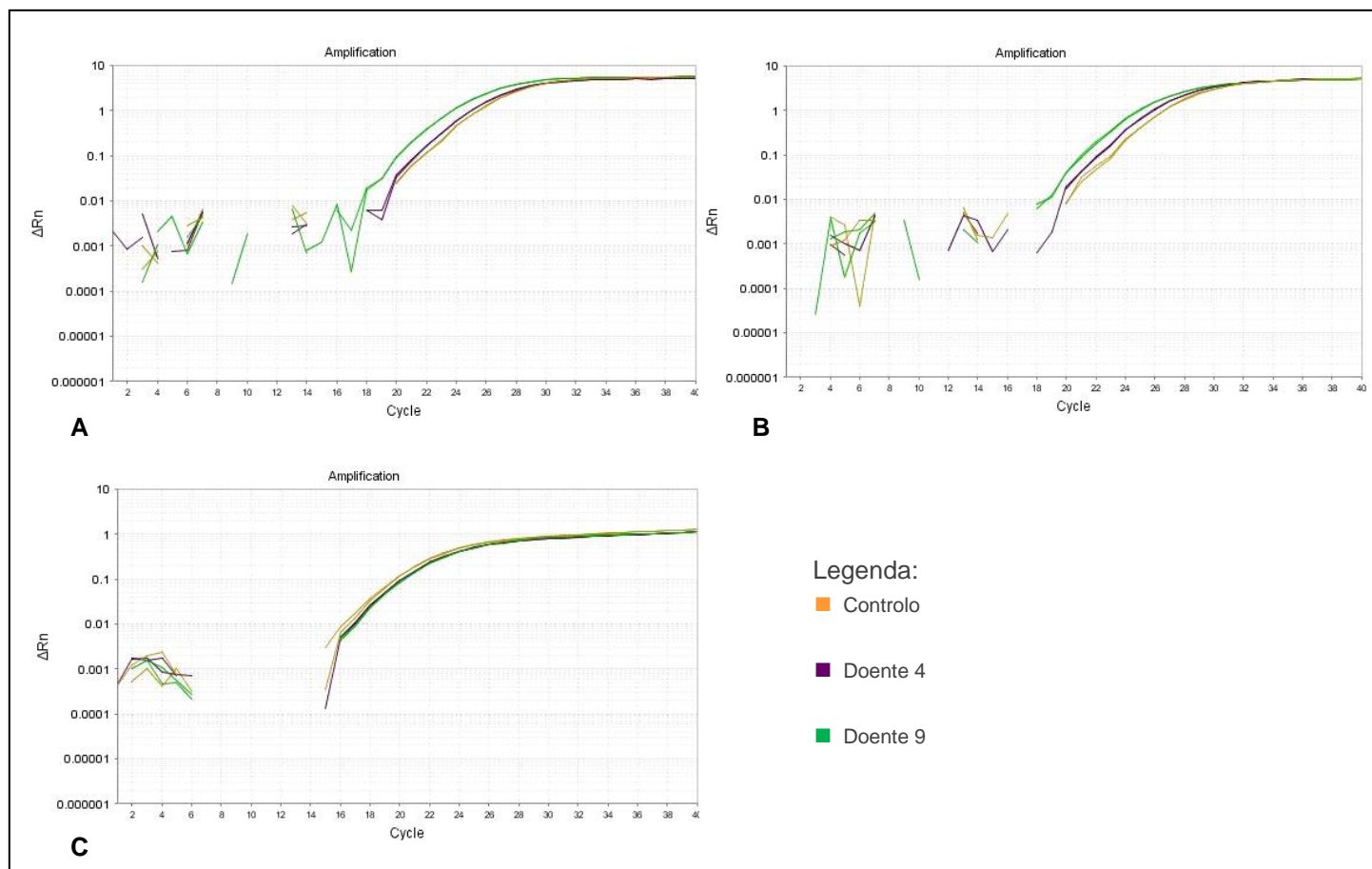


Figura 4.6. Exemplos de curvas de amplificação de um controlo (a amarelo), do doente 4 (a roxo) e do doente 9 (a verde), a partir das sondas testadas, nas reacções de PCR em tempo real: **A** - CAPN3 A; **B** - CAPN3 B; **C** - GAPDH. ΔRn , intensidade de fluorescência normalizada em função da fluorescência residual; *Cycle*, número do ciclo da reacção de PCR em tempo real. *Amplification*, amplificação

A análise destas curvas sugeriu nitidamente a ocorrência de diferenças na amplificação do gene *CAPN3* entre os controlos e os doentes, assim como entre os próprios doentes, independentemente da sonda utilizada que reconhece o gene *CAPN3* (Figura 4.6A e B). Essas diferenças traduziram-se em valores de ΔRn mais elevados para os doentes em relação às amostras controlo. Pelo contrário, no caso da sonda relativa ao controlo endógeno (Figura 4.6C) não foram verificadas alterações significativas nos perfis de amplificação obtidos entre todas as amostras em estudo.

Posteriormente, a partir das curvas referidas, procedeu-se ao cálculo das quantidades relativas de expressão génica (RQ) e os valores obtidos foram apresentados graficamente em função da amostra analisada (Figura 4.7).

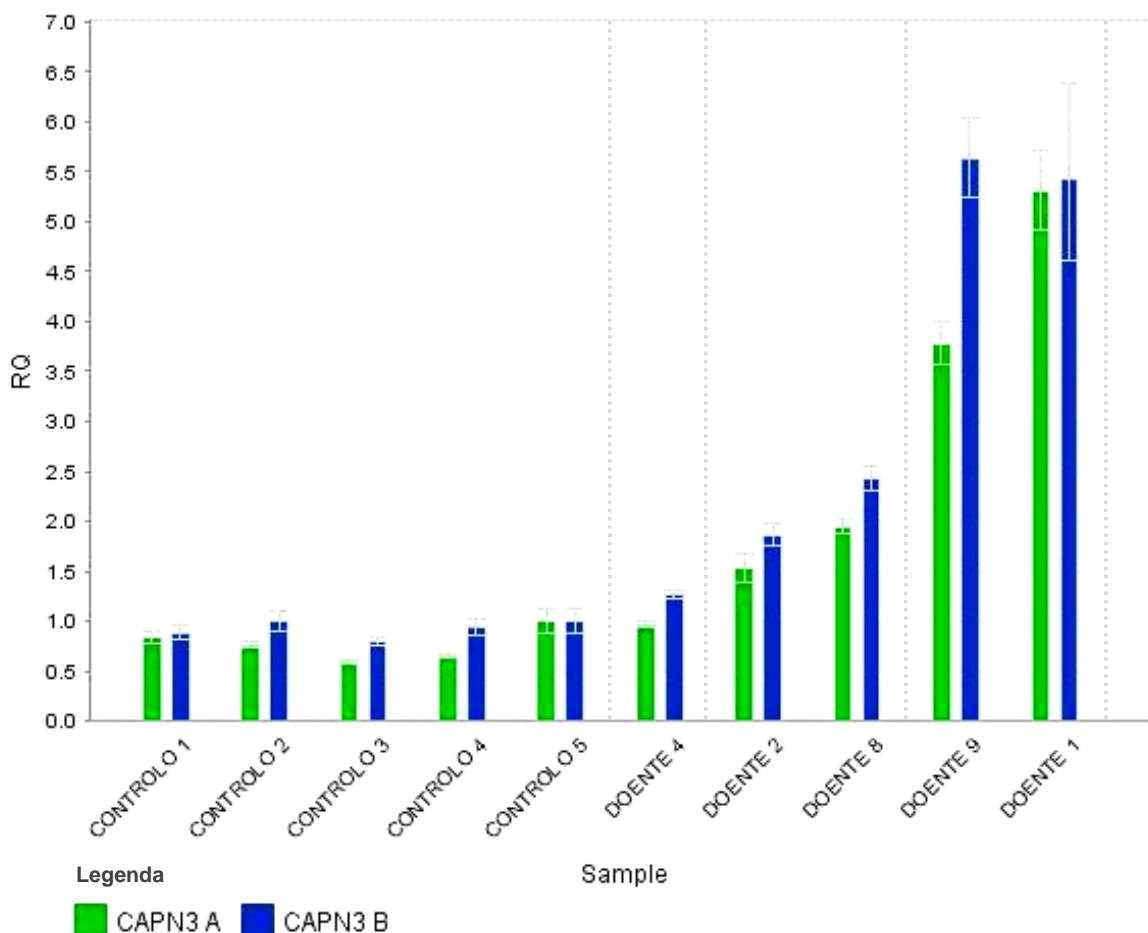


Figura 4.7. Representação dos valores de RQ obtidos em cada amostra (*sample*) após análise informática. Os valores foram corrigidos em função do controlo endógeno (GAPDH). O controlo normal 5 foi usado como referência nos cálculos comparativos de expressão do gene *CAPN3*, uma vez que foi aquele que apresentava maior expressão entre os controlos usados (RQ=1). A sonda *CAPN3 A* está representada a verde e a sonda *CAPN3 B* a azul.

A análise dos valores de RQ evidenciaram a presença de 3 perfis distintos de expressão do gene *CAPN3* entre os 5 doentes estudados, relativamente às amostras controlo. Assim, na maioria dos doentes, observou-se um aumento da expressão do gene *CAPN3*, que é ~1,5 a 2,5 vezes superior ao normal no caso dos doentes 2 e 8, e surpreendentemente, esse aumento é ainda mais elevado no caso dos doentes 1 e 9 (entre ~3,5 a 5,5 vezes superior ao normal). O doente 4, pelo contrário, não apresentou alterações aparentemente significativas no nível de expressão deste gene em relação aos níveis considerados normais.

A interpretação final dos dados obtidos com esta metodologia permitiu concluir que a mutação causal identificada no doente 4 (c.2362_2363delinsTCATCT em homozigotia), não parece condicionar os níveis de expressão do gene da *CAPN3* muscular.

Em relação aos doentes 2 e 8, o aumento de expressão identificado parece sugerir a ocorrência de um mecanismo de compensação do músculo, por intermédio do aumento da transcrição do gene *CAPN3*, em resposta ao defeito molecular identificado (apesar de ainda não ter sido detectado o segundo alelo mutado no doente 8).

Inesperadamente, os doentes 1 e 9 apresentaram a diferença mais significativa de expressão do gene *CAPN3* em relação às amostras controlo. O elevado aumento de expressão observado pode ser um indicador da presença de um outro factor molecular responsável pelo fenótipo clínico associado a estes doentes, uma vez que apenas foi identificado um único alelo mutado após estudo molecular do gene *CAPN3*.

Dada a quantidade limitada de RNA total muscular disponível, não foi possível efectuar os estudos de expressão génica nos restantes doentes estudados no presente trabalho (doentes 3, 5, 6 e 7).

4.3 Análise semi-quantitativa da abundância de CAPN3 e DYSF por *Western blotting*

Considerando a variabilidade fenotípica associada às LGMD, torna-se necessário recorrer a determinadas metodologias para orientar o estudo genético. Nestes casos, a identificação do defeito molecular associado não pode ser realizado através do rastreio sistemático de mutações nos diversos genes envolvidos, devido ao elevado custo que este tipo de rastreio implica, usando a tecnologia actualmente disponível. Por este motivo, a análise de proteínas musculares por WB em *multiplex* tem-se revelado uma ferramenta útil na escolha do gene alvo a estudar no diagnóstico destes doentes (Fanin *et al.* 2003). No caso da LGMD2A, a análise por WB assume um papel ainda mais importante, dada a baixa especificidade do estudo histoquímico da *CAPN3* (Charlton *et al.* 2009, Barresi 2011).

Assim, procedeu-se à análise semi-quantitativa da abundância muscular da *CAPN3* e *DYSF* dos doentes 1 a 8, da seguinte forma: (i) homogeneização de amostras musculares para extracção de proteína total; (ii) separação da proteína total muscular por SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose (WB); (iii) imunodeteção da *CAPN3*, da *DYSF* e do b-DG nos *blots* com anticorpos específicos; e (iv) análise

densitométrica das bandas proteicas, após normalização em função da MIO não transferida.

A Figura 4.8 apresenta o resultado obtido após *Immunoblotting* para cada doente estudado em comparação com uma amostra muscular normal.

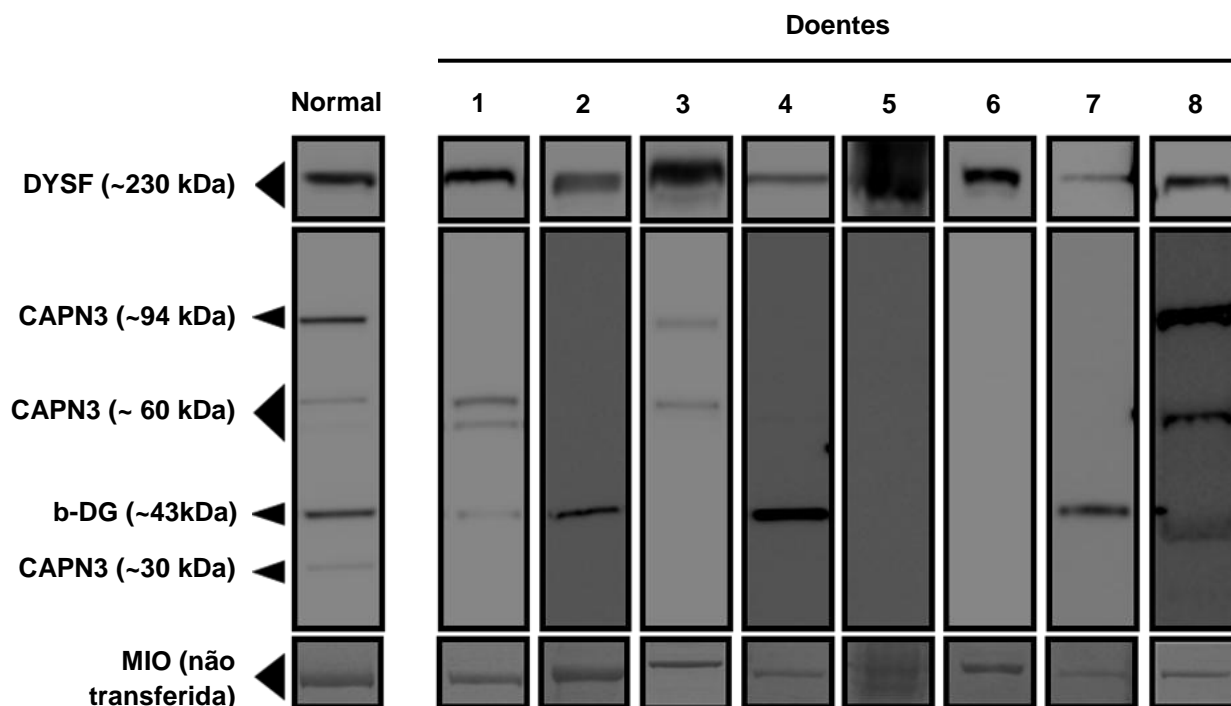


Figura 4.8. Análise das proteínas musculares por *Immunoblotting* em homogeneizados de proteína total muscular, de um controlo e dos doentes 1 a 8. O b-DG foi usado como controlo muscular endógeno. A banda de MIO não transferida no gel de SDS-PAGE foi corada com *Coomassie blue R250*.

A determinação da abundância das proteínas musculares foi realizada tendo em consideração a qualidade das amostras musculares associada, frequentemente, a degradação generalizada do conteúdo proteico muscular. Por este facto, foram calculadas abundâncias relativas das proteínas por comparação entre os doentes e amostras normais, de acordo com a seguinte nomenclatura: -, ausência total; +, abundância normal; ++, abundância superior ao normal. Pelo mesmo motivo, no caso da CAPN3 foi determinada uma abundância total relativa que corresponde à totalidade das abundâncias parciais da forma *full-length* (~94 kDa) e dos fragmentos proteolíticos de ~60 e ~30 kDa.

A Tabela 4.1 mostra as abundâncias relativas determinadas para cada doente em relação a controlos musculares.

Tabela 4.1. Abundâncias relativas da CAPN3 e da DYSF nos homogeneizados musculares analisados por *Immunoblotting* e densitometria. Os valores calculados foram normalizados em função da quantidade de MIO não transferida no gel e expressos de acordo com a seguinte nomenclatura: -, ausência total; +, abundância normal; ++, abundância superior ao normal.

Doente	CAPN3	DYSF
1	+	++
2	-	+
3	+	+
4	-	++
5	-	ND
6	-	+
7	-	+
8	+	+

ND, não determinado. -, Ausência total; +, abundância normal; ++, abundância superior ao normal.

O cálculo das abundâncias relativas permitiu concluir que os doentes 1, 3 e 8 apresentavam abundância normal de CAPN3 muscular, quando comparados com amostras controlo (Tabela 4.1). No caso do doente 1 (Figura 4.8), a abundância relativa foi calculada com base nos fragmentos proteolíticos de ~60 kDa, uma vez que não foi possível visualizar a CAPN3 na sua forma *full-length* (~94 kDa), provavelmente devido às condições inadequadas referidas no acondicionamento da biópsia muscular. Este facto pode também ser o responsável pelo fraco sinal observado para o b-DG.

No estudo molecular do gDNA do doente 3 foi identificada uma deleção em homozigotia (c.60delA) no gene *CAPN3* que, presumivelmente, originaria uma proteína truncada (p.P22Qfs*35). Assim, não seria de esperar a presença da forma *full-length* (ou mesmo dos outros produtos proteolíticos) da CAPN3 na análise realizada por WB, tal como detectado. Esta observação permite especular a ocorrência de alterações ao nível do mecanismo de *splicing* (por exemplo, como a presença de processos de *exon*

skipping), fazendo com que a CAPN3 seja expressa em níveis normais e sob a forma *full-length* no músculo deste doente.

Pelo contrário, nos doentes 2, 4, 5, 6 e 7 não foi aparentemente detectada a proteína CAPN3 na sua forma *full-length*, nem qualquer outro fragmento proteolítico (Figura 4.8). No entanto, no caso dos doentes 5 e 6 também não se verificou a presença da banda referente ao b-DG, que foi utilizado como controlo muscular interno. Contudo, a não observação da CAPN3 nestes 5 doentes pode também estar relacionada com uma abundância muito reduzida da CAPN3 muscular, sendo por isso mais dificilmente detectada devido aos processos de degradação referidos ou ao seu tempo de semi-vida curto (Fanin *et al.* 2004, Fanin *et al.* 2007).

De acordo com o estudo molecular do doente 4 seria de esperar que fosse detectada uma banda proteica de tamanho inferior a 94 kDa após *Immunoblotting* porque, segundo a previsão *in silico*, esta alteração resultaria numa proteína truncada com 801 aminoácidos. Contudo, o resultado obtido neste trabalho confirma o estudo previamente realizado num laboratório estrangeiro. O facto de não ter sido detectada a CAPN3 no *Immunoblot* do doente 4, pode sugerir que o transcrito resultante da transcrição do gDNA deste doente possa ter sido sujeito a fenómenos de NMD, evitando a tradução da proteína.

Assim, estes resultados permitem concluir que, no caso dos doentes 2, 4, 5, 6 e 7, o fenótipo da LGMD2A pode estar associado a um défice quantitativo de CAPN3, enquanto que os doentes 1, 3 e 8 não apresentam alterações na abundância muscular de CAPN3.

O estudo da abundância da DYSF foi também efectuado uma vez que existem dados publicados na bibliografia que referem a diminuição da sua expressão em doentes com LGMD2A (Luo *et al.* 2011). A DYSF foi aparentemente evidenciada em níveis de abundância muscular superior ao normal nos doentes 1 e 4 (Tabela 4.1), enquanto que os restantes doentes apresentaram valores normais. Logo, a DYSF parece não estar afectada nos doentes analisados. O aumento da abundância de DYSF muscular verificada nos doentes 1 e 4 poderá não ser significativo, dado o baixo número de controlos usados.

Não foi possível efectuar a análise da abundância de proteínas do doente 9 uma vez que não existia amostra de biópsia muscular suficiente para efectuar o estudo.

4.4 Análise da actividade autolítica da CAPN3

Fanin e seus colaboradores (2003) desenvolveram um teste funcional para o estudo da actividade autolítica da CAPN3, uma vez que o estudo da abundância da CAPN3 por WB não é completamente específico (devido à ocorrência de défices secundários), nem completamente sensível, porque que pelo menos 20 % dos doentes LGMD2A diagnosticados molecularmente não apresentam alterações na abundância da CAPN3 (Fanin *et al.* 2003, Zatz e Starling 2005, Kramerova *et al.* 2007).

O teste da actividade autolítica da CAPN3 foi realizado através de um ensaio bioquímico em que as amostras musculares foram homogeneizadas em tampão salino e submetidas a uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após análise por *Immunoblotting*, comparou-se o perfil de degradação da forma *full-length* (~94 kDa) entre os doentes e controlos. Segundo Fanin *et al.* (2003), no caso de uma amostra muscular normal verifica-se o desaparecimento quase completo da banda proteica *full-length* ao fim de 5 minutos e, simultaneamente, o aparecimento progressivo de 3 produtos de degradação de peso molecular mais baixo na ordem dos ~60 kDa (~55, ~58 e ~60 kDa), de acordo com os 5 locais de autólise propostos para a CAPN3 (Figura 1.6, Taveau *et al.* 2003, Diaz *et al.* 2004).

Este teste funcional foi realizado apenas nos doentes 1, 3 e 8, os únicos com abundância muscular normal da CAPN3 (Figura 4.9).

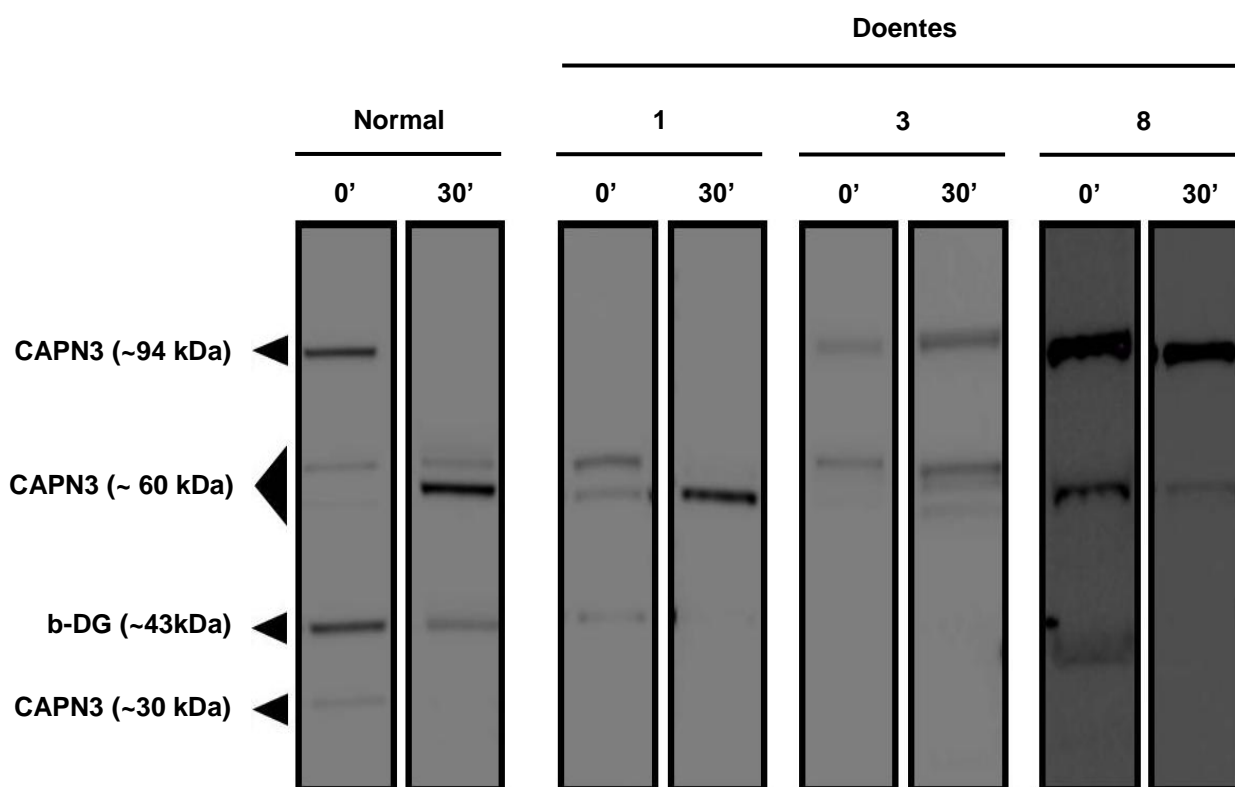


Figura 4.9. Teste da actividade autolítica da CAPN3 muscular nos doentes 1, 3 e 8 e num controlo, no início (0') e depois de 30 minutos (30') de incubação em tampão salino à temperatura ambiente, após *Immunoblotting*.

No doente 1, e após 30 minutos de incubação, verificou-se que, apesar da banda de ~94 kDa não ter sido detectada ao tempo 0', a banda ~60 kDa desapareceu, dando origem a uma banda de menor peso molecular de ~58 kDa, que aumentou de intensidade (Figura 4.9). Este resultado permitiu concluir que a CAPN3 muscular do doente 1 apresenta uma função autolítica normal.

Pelo contrário, observou-se uma conservação das bandas de ~94 e ~60 kDa ao longo de todo o tempo de incubação nos doentes 3 e 8, pelo que se conclui que a actividade autolítica da CAPN3 se encontra afectada nestes doentes (Figura 4.9).

Em relação ao doente 3, o resultado evidenciado pode sugerir que a mutação causal c.60delA (encontrada no exão1) poderá ter influência na clivagem dos locais de autólise na sequência NS (junto ao domínio proteico I), evitando a autólise e afectando a activação da função proteolítica da CAPN3.

No doente 8 apenas foi encontrada a mutação *missense* c.2257A>G em heterozigotia (exão 21 do gene *CAPN3*) que se traduz na alteração de um aminoácido

(p.D753N), que pode resultar na diminuição da eficiência da ligação do Ca^{2+} ao domínio IV da CAPN3 onde se encontra localizada esta mutação. Este efeito, em conjunto com uma segunda alteração no gene *CAPN3* ainda desconhecida, parecem resultar na perda da actividade autolítica.

4.5 Avaliação global dos resultados obtidos

Neste trabalho foram estudados todos os doentes com pelo menos uma alteração causal no gene *CAPN3*, analisados molecularmente na UMOP, e com a indicação de terem realizado biópsia muscular, principal produto biológico de estudo deste trabalho.

Os resultados obtidos foram avaliados tendo em atenção a qualidade geral das amostras musculares, como referido anteriormente, que implica frequentemente uma degradação generalizada do conteúdo proteico muscular. Por este motivo, nos estudos quantitativos realizados não foram determinados valores absolutos, mas valores relativos obtidos por comparação com amostras controlo. Por outro lado, a quantidade de produto disponível também foi reduzida, uma vez que se tratavam de amostras remanescentes de biópsias musculares; por isso não foi possível submeter as amostras musculares a todas as metodologias usadas neste trabalho. Dada a baixa disponibilidade de biópsias musculares, também não foi possível efectuar análises estatísticas dos dados obtidos.

Assim, os resultados obtidos com as diferentes metodologias foram, numa primeira fase, interpretados individualmente. Numa segunda fase, foi realizada uma análise conjunta dos dados seguida de avaliação de correlações entre eles.

A tabela 4.2 resume os resultados obtidos com este trabalho para cada um dos doentes analisados nos diferentes estudos desenvolvidos.

Analisando em conjunto os resultados obtidos individualmente nos diferentes métodos usados, foi possível tirar as conclusões a seguir descritas.

No caso do doente 1, a presença de CAPN3 muscular no WB, a actividade autolítica normal da proteína e o aumento da expressão do gene *CAPN3*, sugerem a exclusão do envolvimento deste gene no fenótipo deste doente, uma vez que, adicionalmente, até agora apenas foi detectado um alelo mutado.

Na análise dos doentes 2 e 4, apesar de ter sido detectada a expressão do gene *CAPN3*, na análise por WB não se verifica a presença da proteína, sugerindo um defeito ao nível pós-transcrição da *CAPN3* nestes doentes.

O defeito da actividade autolítica da *CAPN3* evidenciado após estudo da biópsia muscular do doente 3 parece ser o resultado da mutação causal detectada, ao contrário do que seria de esperar pela previsão *in silico*.

Tal como se verifica nos doentes 2 e 4, os resultados dos doentes 5, 6 e 7 sugerem um défice quantitativo na abundância muscular da *CAPN3*, uma vez que esta não é detectada após *Immunoblotting*.

No caso do doente 8, os resultados obtidos após WB, a perda da actividade autolítica e a expressão do gene *CAPN3*, permitem confirmar o diagnóstico de LGMD2A neste doente (apesar de apenas ter sido identificado um alelo mutado no gDNA) como resultado de um defeito na actividade autolítica. Contudo, seria necessário proceder à sequenciação do cDNA muscular deste doente na tentativa de se identificar um segundo alelo mutado. Adicionalmente, seria pertinente fazer uma reavaliação clínica familiar e estudos de segregação alélica para esclarecer o padrão de hereditariedade desta alteração, uma vez que existem estudos que foram descritas mutações no gene *CAPN3* com apresentação autossómica dominante (Vissing *et al.* 2011).

Finalmente, no doente 9, em comparação com o doente 1, a sobreexpressão muscular do gene *CAPN3* evidenciada indica que a *CAPN3* pode não ser a causa do fenótipo clínico observado; contudo, será necessário realizar outras metodologias (nomeadamente WB em *multiplex*) para confirmar esta hipótese.

Tabela 4.2. Resumo dos resultados obtidos para cada doente a partir de das metodologias realizadas no presente trabalho.

Doente	Alterações detectadas			MLPA	Estudo quantitativo de expressão do gene <i>CAPN3</i>	Estudo da abundância de proteínas		Análise da actividade autolítica da <i>CAPN3</i>
	gDNA	mRNA	Previsão da proteína			CAPN3	DYSF	
1	c.[637C>T][+][=]	r.[=,637c>u]	p.H213Y	Normal	+++	+	++	Normal
2	c.[2306G>A] +[2306G>A]	ND	p.R769Q p.R769Q	ND	++	-	+	ND
3	c.[60delA] +[60delA]	ND	p.P22Qfs*35 p.P22Qfs*35	ND	ND	+	+	Perda
4	c.[2362_2363delins TCATCT] +[2362_2363delinsT CATCT]	ND	p.R788Sfs*14 p.R788Sfs*14	ND	+	-	++	ND
5	c.[1063C>T] +[1468C>T]	ND	p.R355W p.R490W	ND	ND	-	ND	ND
6	c.[2288A>G] +[2306G>A]	ND	p.Y763C p.R769Q	ND	ND	-	+	ND
7	c.[2288A>G] +[2288A>G]	ND	p.Y763C p.Y763C	ND	ND	-	+	ND
8	c.[2257A>G][+][=]	ND	p.D753N	Normal	++	+	+	Perda
9	c.[1063C>G][+][=]	r.[=,1063c>g]	p.R355W	Normal	+++	ND	ND	ND

ND, não determinado. Abundância proteica: -, ausente; +, normal; ++, superior ao normal. Expressão génica: +, normal; ++, ligeiramente aumentada (~1,5-2,5X superior ao normal); +++, muito aumentada (~3,5-5,5X superior ao normal). Nomenclatura de acordo com a HGVS. Sequência de referência para o gene *CAPN3*: NM 000070.2.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

5. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho contribuiu-se para a caracterização detalhada dos doentes incluídos neste estudo por forma a complementar o estudo genético molecular previamente realizado. Neste sentido, foram implementadas novas metodologias de estudo (a nível genómico, transcriptómico e proteómico) que se revelaram fundamentais para o diagnóstico diferencial da LGMD2A, dada a elevada heterogeneidade genética e fenotípica associada dos doentes afectados com este tipo de patologias musculares.

Com a abordagem de estudo proposta foi possível: (i) confirmar ou excluir o diagnóstico de LGMD2A; (ii) atribuir um defeito quantitativo ou funcional dos doentes com LGMD2A; (iii) sugerir outras causas de envolvimento (outros factores que não a CAPN3), principalmente em doentes não confirmados molecularmente.

Tendo em consideração que as metodologias usadas por rotina no diagnóstico molecular da LGMD2A resultam frequentemente em dados inconclusivos, o presente trabalho enfatiza a mais-valia na utilização desta nova abordagem de estudo multidisciplinar nos doentes LGMD2A. Desta forma, combinando técnicas moleculares e bioquímicas foi possível validar as alterações detectadas a nível genómico e/ou orientar no sentido de novos estudos moleculares. Assim, propõe-se a implementação a nível nacional destas metodologias na rotina do diagnóstico da LGMD2A (Figura 5.1), à imagem do que é sugerido por autores de outros países, como no Reino Unido (Groen *et al.* 2007) e Itália (Fanin *et al.* 2008), na tentativa de aumentar o número de casos diagnosticados de LGMD2A.

Contudo, algumas das metodologias propostas deverão ser alargadas a um grupo maior de amostras musculares, de forma a se proceder à sua validação estatística. Neste sentido, será necessário estabelecer protocolos de colaboração com unidades de neuropatologia de hospitais e centros de investigação, como verificado noutros países citados anteriormente.

Futuramente, seria também interessante completar o estudo funcional da CAPN3 dos doentes incluídos neste trabalho através de outras abordagens bioquímicas, nomeadamente, testar a função proteolítica da CAPN3. Milic *et al.* (2007) desenvolveram um ensaio *in vitro* para avaliar a função proteolítica desta proteína que tem por base a utilização de uma CAPN3 inactiva (igual à proteína humana, mas mutada no resíduo de

aminoácido 129: substituição de uma cisteína por uma serina) como substrato de moléculas CAPN3 activas, presentes no homogeneizados musculares de doentes. Esta CAPN3 inactiva não é activada por autólise, mas é usada como substrato das CAPN3 endógenas activas. Se a CAPN3 muscular dos doentes apresentar função proteolítica afectada não serão observadas as bandas referentes aos produtos de proteólise do substrato após *Immunoblotting*.

No caso dos doentes em que o diagnóstico molecular continua por esclarecer, estes poderão ser utilizados como candidatos na aplicação de técnicas que possibilitam o estudo simultâneo de um grupo de genes ou proteínas relacionado com as Distrofias Musculares, como o WB em *multiplex* ou recorrendo à nova geração de sequenciadores (NGS, *next generation sequencing*) em larga escala, no sentido de orientar o estudo, numa fase posterior, identificar o defeito molecular associado (Figura 5.1).

A Figura 5.1 é uma representação esquemática de uma nova perspectiva global no estudo de LGMD2A, envolvendo as metodologias implementadas neste trabalho, assim como novas tecnologias emergentes.

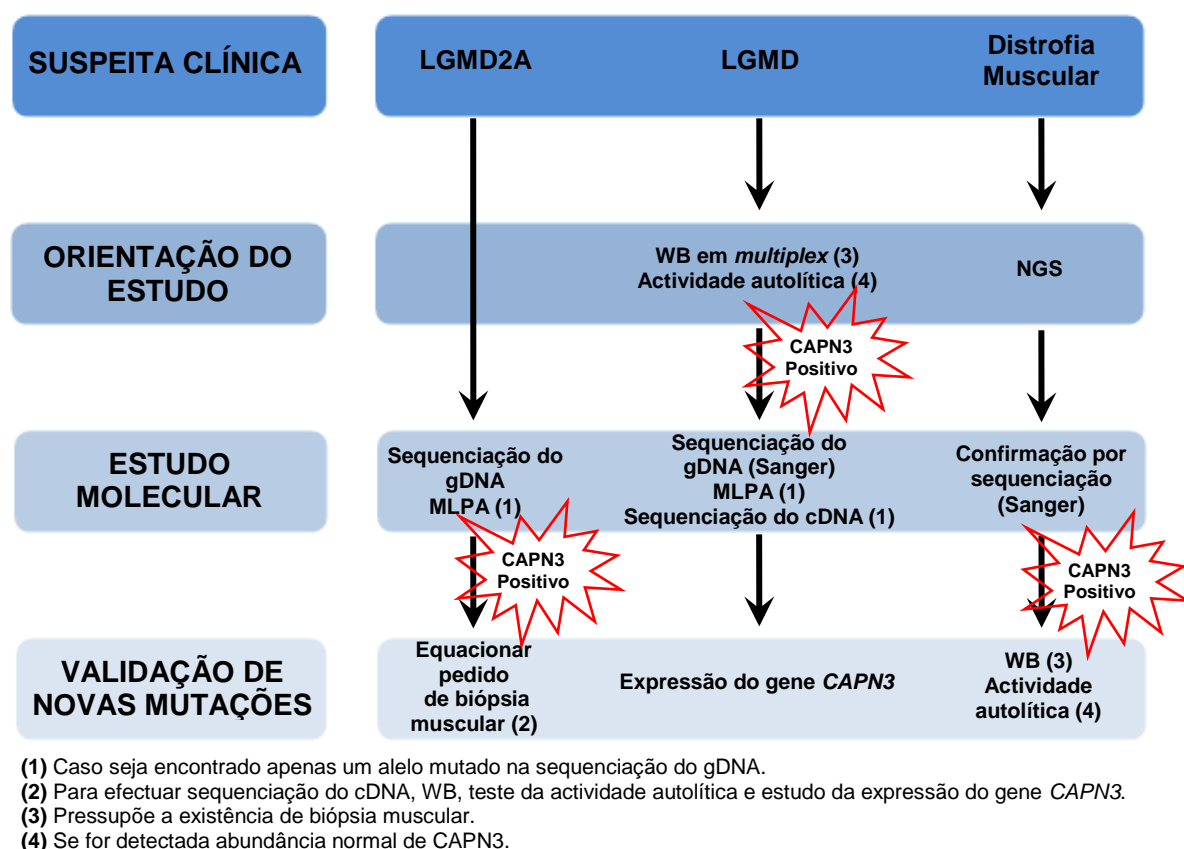


Figura 5.1. Nova abordagem proposta no estudo de LGMD2A, considerando as novas metodologias envolvidas no presente trabalho e novas técnicas emergentes.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 Referências em publicações periódicas

Anderson LVB, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tomé FMS, Hubner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS. **Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A.** *Am J Pathol* 1998, **153**:1169-1179.

Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KMD. **Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Myoshi myopathy (primary dysferlinopathies.** *Neuromuscul Disord* 2000, **10**:553-559.

Angelini C, Nardetto L, Fanin M, Nascimbeni AC, Tasca E. **Heterogeneous pathogenesis of LGMD2: consequences for therapy.** *Basic Appl Myol* 2007, **17**:173-179.

Baker KE, Parker R. **Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression.** *Cell Biol* 2004, **16**:293-299.

Barresi R. **From proteins to genes: immunoanalysis is the diagnosis of muscular dystrophies.** *Skelet Muscle* 2011, **1**:24-39.

Beckmann JS. **Disease taxonomy-monogenic muscular dystrophy.** *Brit Med Bull* 1999, **55**:340-357.

Benyamin Y. **The structural basis of calpain behaviour.** *FEBS Journal* 2006, **273**:3413-3414.

Berti PJ, Storer AC. **Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases.** *J Mol Biol* 1995, **246**:273-283.

Bushby KM. **The limb-girdle muscular dystrophies.** *Eur J Paediatr Neurol* 1999, **3**:87-88.

Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitás K, Labeit S, Granzier H. **Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness.** *Circ Res* 2000, **86**:59-67.

Charlton R, Henderson M, Richards J, Hudson J, Straub V, Bushby K, Barresi R. **Immunohistochemical analysis of calpain 3: advantages and limitations in diagnosing LGMD2A.** *Neuromuscul Disord* 2009, **19**:449-457.

Chiannikulchai N, Pasturaud P, Richard I, Auffray C, Beckman JS. **A primary expression map of the chromosome 15q15 region containing the recessive form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2A) gene.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**:717-725.

Cohen N, Kudryashova E, Kramerova I, Anderson LVB, Beckmann JS, Bushby K, Spencer MJ. **Identification of putative *in vivo* substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice.** *Proteomics* 2006, **6**:6075-6084.

Cohn RD, Campbell KP. **Molecular basis of muscular dystrophies.** *Muscle Nerve* 2000, **3**:1456-1471.

Diaz BG, Moldoveanu T, Kuiper MJ, Campbell RL, Davies PL. **Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide.** *J Biol Chem* 2004, **279**:27656-27666.

Duguez S, Bartoli M, Richard I. **Calpain-3: a key regulator of the sarcomer?** *FEBS Journal* 2006, **273**:3427-3436.

Duno M, Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. **cDNA anakyses of CAPN3 enhance mutation detection and reveal a low prevalence of LGD2A patients in Denmark.** *Eur J Hum Genet* 2008, **16**:935-940.

Ermolova N, Kudryashova E, DiFranco M, Vergara J, Kramerova I, Spencer MJ. **Pathogenity of some limb girdle muscular dystrophy mutations can result from reducer anchorage to myofibrils and altered stability of calpain 3.** *Hum Mol Genet* 2011, **20**:331-3345.

Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC, Spinazzi M, Piluso G, Ventriglia VM, Ruzza G, Siciliano G, Trevisian CP, Politano L, Nigro V, Angelini C. **Molecular diagnosis in LGMD2A: mutation analysis or protein testing?** *Hum Mut* 2004, **24**:52-62.

Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. **The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy.** *Neuromuscul Disord* 2005, **15**:218-224.

Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. **Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression.** *Am J Pathol* 2003, **163**:1929-1936.

Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C. **Screening of calpain-3 autolytic activity in LGMD muscle: a functional map of CAPN3 gene mutations.** *J Med Genet* 2007, **44**:38-43.

Fanin M, Nascimbeni AC, Tasca E, Angelini C. **How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A.** *Eur J Hum Genet* 2008, 1-6.

Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH, Angelini C. **Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy.** *Neurology* 2001, **56**:660-665.

Figarella-Branger D, El-Dassouki M, Saenz A, Cobo AM, Malzac P, Tong S, Cassotte E, Azulay JP, Pouget J, Pellissier JF. **Myopathy with lobulated muscle fibers: evidence for heterogeneous etiology and clinical presentation.** *Neuromuscul Disord* 2002, **12**:4-12.

Gaina G, Manole E, Bordea C, Ionica E. **Analysis of calpain-3 in LGMD2A.** *Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)* 2008, **18**:181-186.

Groen EJ, Charlton R, Barresi R, Anderson LV, Eagle M, Hudson J, Koref MS, Straub V, Bushby KMD. **Analysis of the UK diagnostic strategy for limb girdle muscular dystrophy 2A.** *Brain* 2007, **130**:3237-3249.

Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. **Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation.** *EMBO Journal* 1999, **18**:6880-6889.

Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Kato T, Nishino I. **Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling.** *J Neurosci Res* 2007, **57**:513-521.

Kramerova I, Beckmann JS, Spencer MJ. **Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A).** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1772**:128-144.

Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Ottenheijm C, Granzier H, Spencer MJ. **Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle.** *Hum Mol Genet* 2008, **17**:3271-3280.

Laval SH, Bushby KM. **Limb-girdle muscular dystrophies – from genetics to molecular pathology.** *Neuropath Appl Neuro* 2004, **30**:91-105.

Lebart MC, Benyamin Y. **Calpain involvement in the remodelling of cytoskeletal anchorage complexes.** *FEBS Journal* 2006, **273**:3415-3426.

Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.** *J Biochem Biophys Methods* 2001, **25**:402-408.

Luo SS, Xi JY, Lu JH, Zhao CB, Zhu WH, Lin J, Wang Y, Ren HM, Yin B, Andoni UJ. **Clinical and pathological features in 15 chinese patients with calpainopathy.** *Muscle Nerve* 2011, **43**:402-409.

Macqueen D, Meischke L, Manthri S, Anwar A, Solberg C, Johnston IA. **Characterisation os *capn1*, *capn2*-like, *capn3* e *capn11* genes in atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus* L.): transcriptional regulation across tissues and in skeletal muscle at distinct nutritional states.** *Gene* 2010, **453**:45-58.

Millic A, Daniele N, Lochmuller H, Mora M, Comi GP, Moggio M, Noulet F, Walter MC, Morandi L, Poupiot J, Roudaut C, Bittner RE, Bartoli M, Richard I. **A third of Igmd2A have normal calpain 3 proteolytic activity as ddetermined by an *in vitro* assay.** *Neuromuscul Disord* 2007, **17**:148-156.

Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE. **Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin.** *Nat Genet* 2000, **24**:163-166.

Morrée A, Hulsik DL, Impagliazzo A, Haagen HHHBM, Galan P, Remoortere A, Hoen PAC, Ommen GB, Frants RR, Maarel SM. **Calpain 3 is a rapid-action, unidirectional proteolytic switch central to muscle remodeling.** *PLoS One* 2010, **5**:1-11.

Murphy RM. **Calpains, skeletal muscle function and exercise.** *Proc Aust Physiol Soc* 2009, **40**:95-105.

Murphy RM, Lamb GD. **Endogenous calpain-3 activation is primarily governed by small increases in resting cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ and is not dependent on stretch.** *J Biol Chem* 2009, **284**:7811-7819.

Murphy RM, Goodman CA, McKenna MJ, Bennie J, Leikis M, Lamb GD. **Calpain-3 is autolyzed and hence activated in human skeletal muscle 24 h following a single bout eccentric exercise.** *J Appl Physiol* 2007, **103**:926-931.

Nascimbeni AC, Fanin M, Tasca E, Angelini C. **Transcriptional and translational effects of intronic *CAPN3* gene mutations.** *Human Mut* 2010, **31**:1658-1669.

Navarro C, Teijeira S. **Miopatología. Nuevo concepto. Nuevo laboratorio.** *Neurologia* 2004, **19**:168-182.

Nowak KJ, Davies KE. **Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment.** *Euro Mol Biol Organ J* 2004, **5**:872-876.

Ohlendieck KT. **An understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: Linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibers.** *Eur J Cell Biol* 1996, **69**:1-10.

Ojima K, Ono Y, Ottenheijm C, Hata S, Suzuki H, Granzier H, Sorimachi H. **Non-proteolytic functions of calpain-3 in sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles.** *J Mol Biol* 2011, **407**:439-449.

Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, Belsito A, Totaro A, Saccone V, Topaloglu H, Nascimbeni AC, Fulizio L, Broccolini A, Canki-Klain N, Comi LI, Nigro G, Angelini C, Nigro V. **Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes.** *J Med Genet* 2005, **42**:686-693.

Pollitt C, Anderson LVB, Pogue R, Davison K, Pyle A, Bushby KMD. **The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach.** *Neuromuscul Disord* 2001, **11**:287-296.

Protasi F, Paolini C, Nakai J, Beam KG, Franzini-Amstrong C, Allen PD. **Multiple regions of RyR1 mediate functional and structural interactions with α_{1S} -dihydropyridine receptors in skeletal muscle.** *Biophys J* 2002, 3230-3244.

Richard I, Beckmann J. **Molecular diagnosis of calpainopathies.** *Muscular Dystrophy; Methods and Protocols* (Ed. Bushby KMD & Naderson LVB) Humana Press 2001, 273-287.

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougere F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos-Bueno MR, Zatz M, Tischfield JA, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann JS. **Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A.** *Cell Press* 1995, **81**:27-40.

Sáenz A, Azpitarte M, Armañanzas R, Leturcq F, Alzualde A, Inza I, García-Bragado F, De la Herran G, Corcuera J, Cabello A, Navarro C, De la torre C, Gallardo E, Illa I, López de Munain A. **Gene expression profiling in limb-girdle muscular dystrophy 2A.** *PLoS One* 2008, **3**(11):e3750.

Sáenz A, Letureq F, Cobo AM, Poza JJ, Ferrer X, Otaegui D, Camaño P, Urtasun M, Vílchez J, Gutiérrez-Rivas E, Emparanza J, Merlini L, Paisán C, Gocicoechea M, Blázquez L, Eymard B, Lochmuller H, Walter M, Bonnemann C, Figarella-Branger D, Kaplan JC, Urtizberea JA, Martí-Massó JF, López de Munain A. **LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene.** *Brain* 2005, **128**:732-742.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**: 1-13.

Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, Suzuki K. **Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence.** *J Biol Chem* 1995, **270**:31158-31162.

Sorimachi H, Ohmi SI, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minanmi Y, Suzuki K. **Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m-type and mu-type specific expression of the messenger RNA in skeletal muscle.** *J Biol Chem* 1989, **264**:20106-20111.

Starub V, Bushby K. **The childhood limb-girdle muscular dystrophies.** *Semin Pediatr Neurol* 2006, **13**:104-114.

Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, Bode W. **The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:588-592.

Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. **Structure, activation and biology of calpain.** *Diabetes* 2004, **53**:12-18.

Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I. **Calpain 3 is activated trough autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:9127-9135.

Vissing J, Sveen ML, Duno M. **Dominant inheritance of limb girdle muscular dystrophy type 2A.** *Neuromuscul Disord* 2011, **21**:750.

Zatz M, Paula F, Starling A. **The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies.** *Neuromuscul Disord* 2003, **13**:532-544.

Zatz M, Starling A. **Calpains and disease.** *New Engl J Med* 2005, **23**:2413-2423.

6.2 Referências eletrônicas

Applied Biosystems. Página consultada em Novembro de 2011.
<<http://www.appliedbiosystems.com>>.

Human Genome Variant Society. Página consultada em Outubro de 2011.
<<http://www.hgvs.org>>.

Leiden Muscular Dystrophy Pages. Página consultada em Novembro de 2011.
<<http://www.dmd.nl>>.

MRC-Holland. Página consultada em Novembro de 2011. <<http://www.mlpa.com>>.

Rutgers. Página consultada em Outubro de 2011.
<<http://www.rci.rutgers.edu/~uzwaik/AnatPhys/APFIIILect12.html>>.

World Muscle Society. Página consultada em Novembro de 2011.
<<http://www.musclegenetable.org>>.

